

Caractéristiques inhabituelles du génome du SRAS-CoV-2 suggérant des informations sophistiquées Modification en laboratoire plutôt qu'évolution naturelle et délimitation de sa voie de synthèse probable

Li-Meng Yan (MD, PhD)¹ , Shu Kang (PhD)¹ , Jie Guan (PhD)¹ , Shanchang Hu (PhD)¹

¹ Rule of Law Society & Rule of Law Foundation, New York, NY, États-Unis.

Correspondance : team.lmyan@gmail.com

Résumé

La pandémie de COVID-19 causée par le nouveau coronavirus SARS-CoV-2 a entraîné plus de 910 000 décès dans le monde et une décimation sans précédent de l'économie mondiale. Malgré son énorme impact, l'origine du SRAS-CoV-2 est restée mystérieuse et controversée. La théorie de l'origine naturelle, bien que largement acceptée, manque de soutien substantiel. La théorie alternative selon laquelle le virus pourrait provenir d'un laboratoire de recherche est cependant strictement censurée dans les revues scientifiques à comité de lecture. Néanmoins, le SRAS-CoV-2 présente des caractéristiques biologiques incompatibles avec un virus zoonotique naturel. Dans ce rapport, nous décrivons les preuves génomiques, structurelles, médicales et de la littérature qui, lorsqu'elles sont considérées ensemble, contredisent fortement la théorie de l'origine naturelle. Les preuves montrent que le SRAS-CoV-2 devrait être un produit de laboratoire créé en utilisant les coronavirus de chauve-souris ZC45 et/ou ZXC21 comme modèle et/ou colonne vertébrale. Sur la base des preuves, nous postulons en outre une voie synthétique pour le SRAS-CoV-2, démontrant que la création en laboratoire de ce coronavirus est pratique et peut être réalisée en environ six mois. Notre travail souligne la nécessité d'une enquête indépendante sur les laboratoires de recherche concernés. Il plaide également pour un regard critique sur certaines données récemment publiées, qui, bien que problématiques, ont été utilisées pour soutenir et revendiquer une origine naturelle du SARS-CoV-2. Du point de vue de la santé publique, ces actions sont nécessaires car la connaissance de l'origine du SRAS-CoV-2 et de la façon dont le virus est entré dans la population humaine est d'une importance cruciale dans le contrôle fondamental de la pandémie de COVID-19 ainsi que dans la prévention de situations similaires. , futures pandémies.

Introduction

Le COVID-19 a provoqué une pandémie mondiale dont l'ampleur et la gravité sont sans précédent. Malgré les efforts considérables déployés par la communauté mondiale, la gestion et le contrôle de cette pandémie restent difficiles et difficiles.

En tant que coronavirus, le SARS-CoV-2 diffère considérablement des autres virus respiratoires et/ou zoonotiques : il attaque plusieurs organes ; il est capable de subir une longue période d'infection asymptomatique ; il est hautement transmissible et significativement mortel dans les populations à haut risque ; il est bien adapté à l'homme depuis le tout début de son émergence¹ ; il est très efficace pour se lier au récepteur ACE2 humain (hACE2), dont l'affinité est supérieure à celle associée à l'ACE2 de tout autre hôte potentiel^{2,3}.

L'origine du SRAS-CoV-2 fait encore l'objet de nombreux débats. Une publication de Nature Medicine largement citée a affirmé que le SRAS-CoV-2 provenait très probablement de la nature⁴. Cependant, l'article et sa conclusion centrale sont maintenant contestés par des scientifiques du monde entier⁵⁻¹⁵. De plus, les auteurs de cet article de Nature Medicine montrent des signes de conflit d'intérêts^{16,17}, ce qui soulève de nouvelles inquiétudes quant à la crédibilité de cette publication.

Les publications scientifiques existantes soutenant une théorie de l'origine naturelle s'appuient fortement sur un seul élément de preuve - un coronavirus de chauve-souris découvert précédemment nommé RaTG13, qui partage une identité de séquence de nucléotides à 96% avec le SARS-CoV-218. Cependant, l'existence de RaTG13 dans la nature et la véracité de sa séquence rapportée sont largement remises en question^{6-9,19-21}. Il est à noter que les revues scientifiques ont clairement censuré toute opinion dissidente suggérant une origine non naturelle du SRAS-CoV-28,22. En raison de cette censure, les articles remettant en question soit l'origine naturelle du SRAS-CoV-2, soit l'existence réelle du RaTG13, bien que de haute qualité scientifique, ne peuvent exister que sous forme de prépublications^{5-9,19-21} ou d'autres articles non évalués par des pairs publiés sur diverses plateformes en ligne^{10-13,23}. Néanmoins, les analyses de ces rapports ont souligné à plusieurs reprises de graves problèmes et une fraude probable associée au signalement du RaTG13^{6,8,9,19-21}. Par conséquent, la théorie selon laquelle des données scientifiques fabriquées ont été publiées pour induire en erreur les efforts mondiaux pour retracer l'origine du SARS-CoV-2 est devenue substantiellement convaincante et est liée à la notion que le SARS-CoV-2 est d'origine non naturelle.

Conformément à cette notion, les preuves génomiques, structurales et de la littérature suggèrent également une origine non naturelle du SRAS-CoV-2. De plus, une littérature abondante indique que la recherche sur le gain de fonction a depuis longtemps atteint le stade où les génomes viraux peuvent être conçus et manipulés avec précision pour permettre la création de nouveaux coronavirus possédant des propriétés uniques. Dans ce rapport, nous présentons ces preuves et les analyses associées. La partie 1 du rapport décrit les caractéristiques génomiques et structurales du SRAS-CoV 2, dont la présence pourrait être cohérente avec la théorie selon laquelle le virus est un produit de modification en laboratoire au-delà de ce qui pourrait être offert par un simple passage viral en série. La partie 2 du rapport décrit une voie hautement probable pour la création en laboratoire du SRAS-CoV-2, dont les étapes clés sont étayées par des preuves présentes dans le génome viral. Il est important de noter que la partie 2 doit être considérée comme une démonstration de la manière dont le SRAS-CoV-2 pourrait être créé de manière pratique dans un laboratoire en peu de temps en utilisant des matériaux disponibles et des techniques bien documentées. Ce rapport est produit par une équipe de scientifiques expérimentés utilisant notre expertise combinée en virologie, biologie moléculaire, biologie structurale, biologie computationnelle, développement de vaccins et médecine.

1. Le SRAS-CoV-2 a-t-il été soumis à une manipulation in vitro ?

Nous présentons trois sources de données pour étayer notre affirmation selon laquelle la manipulation en laboratoire fait partie du historique du SRAS-CoV-2 :

- je. La séquence génomique du SRAS-CoV-2 est étrangement similaire à celle d'un coronavirus de chauve-souris découvert par des laboratoires militaires de la troisième université médicale militaire (Chongqing, Chine) et de l'Institut de recherche en médecine du commandement de Nanjing (Nanjing, Chine).
- ii. Le motif de liaison au récepteur (RBM) au sein de la protéine Spike du SRAS-CoV-2, qui détermine la spécificité d'hôte du virus, ressemble de manière suspecte à celui du SRAS-CoV de l'épidémie de 2003. Les preuves génomiques suggèrent que le RBM a été génétiquement manipulé.
- iii. Le SRAS-CoV-2 contient un site unique de clivage de la furine dans sa protéine Spike, qui est connue pour améliorer considérablement l'infektivité virale et le tropisme cellulaire. Pourtant, ce site de clivage est complètement absent dans cette classe particulière de coronavirus que l'on trouve dans la nature. De plus, de rares codons associés à cette séquence supplémentaire suggèrent la forte possibilité que ce site de clivage de la furine ne soit pas le produit d'une évolution naturelle et ait pu être inséré artificiellement dans le génome du SRAS-CoV-2 par des techniques autres que le simple passage en série ou le multi-événements de recombinaison de souches à l'intérieur de cultures de tissus ou d'animaux co-infectés.

1.1 L'analyse de la séquence génomique révèle que le ZC45, ou un coronavirus de chauve-souris étroitement apparenté, devrait être l'épine dorsale utilisée pour la création du SARS-CoV-2

La structure du génome du SRAS-CoV-2 d'une longueur d'environ 30 000 nucléotides est illustrée à la figure 1. La recherche dans la base de données de séquences NCBI révèle que, parmi tous les coronavirus connus, il y avait deux coronavirus de chauve-souris apparentés, ZC45 et ZXC21, qui partagent la séquence la plus élevée identité avec le SARS-CoV-2 (chaque coronavirus de chauve-souris est à ~89 % identique au SARS-CoV-2 au niveau des nucléotides). La similarité entre le génome du SRAS-CoV-2 et ceux des coronavirus β représentatifs est illustrée à la figure 1. Le ZXC21, qui est identique à 97 % et partage un profil très similaire avec le ZC45, n'est pas représenté. Notez que le virus RaTG13 est exclu de cette analyse étant donné les preuves solides suggérant que sa séquence peut avoir été fabriquée et que le virus n'existe pas dans la nature^{2,6-9}. (Un rapport de suivi, qui résume les preuves à jour prouvant la nature fallacieuse du RaTG13, sera soumis prochainement)

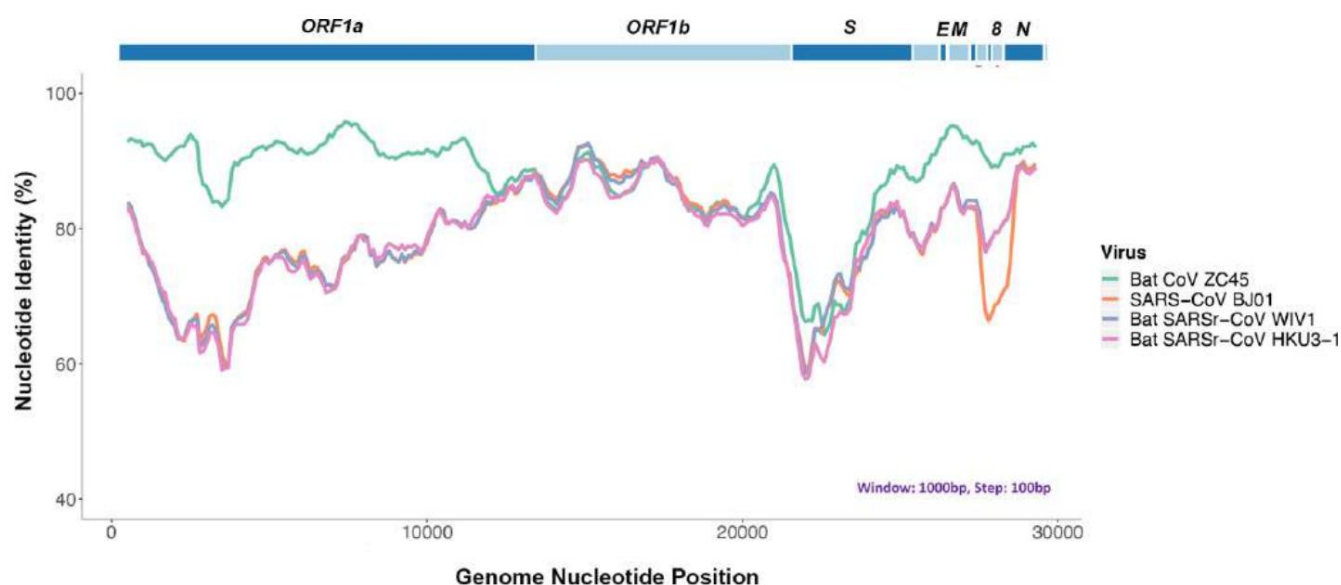


Figure 1. L'analyse de la séquence génomique révèle que le coronavirus de chauve-souris ZC45 est la correspondance la plus proche du SRAS-CoV-2. En haut : organisation génomique du SARS-CoV-2 (2019-nCoV WIV04). En bas : graphique de similarité basé sur le génome complet du 2019-nCoV WIV04. Des génomes complets de SARS-CoV BJ01, bat SARSr-CoV WIV1, bat SARSr-CoV HKU3-1, chauve-souris coronavirus ZC45 ont été utilisés comme séquences de référence.

Lorsque le SRAS-CoV-2 et le ZC45/ZXC21 sont comparés au niveau des acides aminés, une identité de séquence élevée est observée pour la plupart des protéines. La protéine Nucleocapsid est identique à 94 %. La protéine membranaire est identique à 98,6 %. La portion S2 (2e moitié) de la protéine Spike est identique à 95 %. Fait important, la protéine Orf8 est identique à 94,2 % et la protéine E est identique à 100 %.

Orf8 est une protéine accessoire, dont la fonction est largement inconnue dans la plupart des coronavirus, bien que des données récentes suggèrent que l'Orf8 du SRAS-CoV-2 négocie l'évasion de l'immunité adaptative de l'hôte en régulant à la baisse le MHC-I 24. Normalement, l'Orf8 est mal conservé dans coronavirus²⁵. L'explosion de séquence indique que, alors que les protéines Orf8 de ZC45/ZXC21 partagent une identité de 94,2 % avec SARS-CoV-2 Orf8, aucun autre coronavirus ne partage plus de 58 % d'identité avec SARS-CoV-2 sur cette protéine particulière. L'homologie très élevée ici sur la protéine Orf8 normalement mal conservée est très inhabituelle.

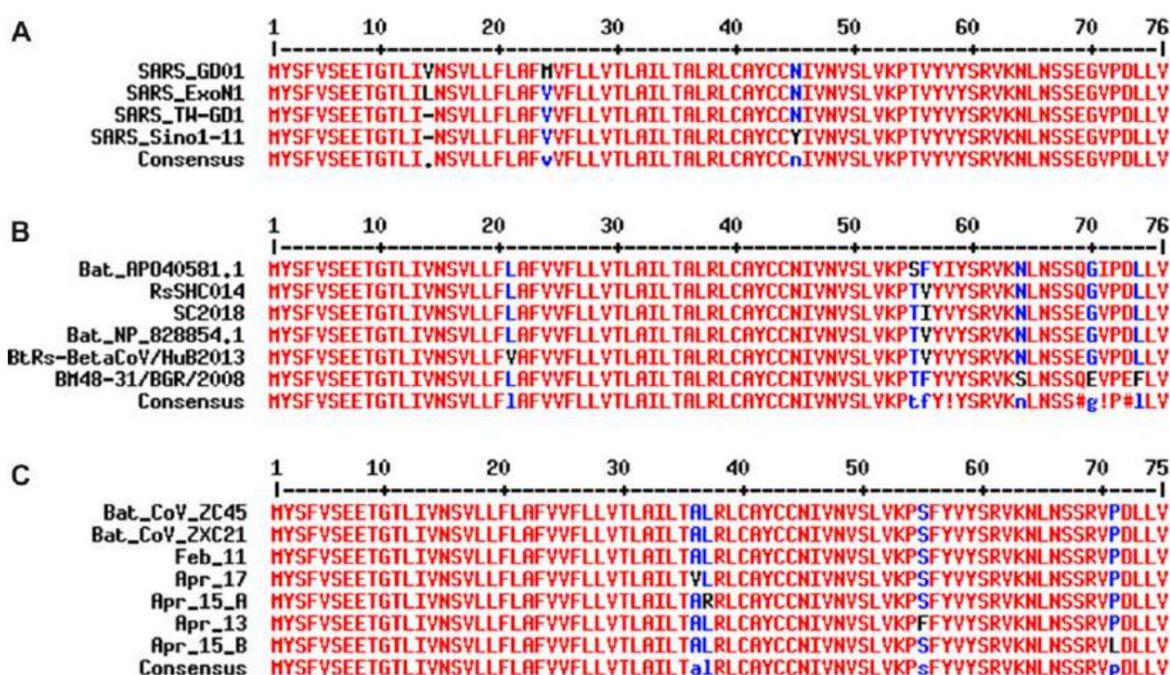


Figure 2. L'alignement des séquences des protéines E de différents coronavirus β démontre la permissivité et la tendance de la protéine E aux mutations d'acides aminés. A. Des mutations ont été observées dans différentes souches de SARS-CoV. Numéros d'accès GenBank : SARS_GD01 : AY278489.2, SARS_ExoN1 : ACB69908.1, SARS_TW_GD1 : AY451881.1, SARS_Sino1_11 : AY485277.1. B. L'alignement des protéines E des coronavirus de chauve-souris apparentés indique sa tolérance aux mutations à plusieurs positions. Numéros d'accès GenBank : Bat_AP040581.1 : APO40581.1, RsSHC014 : KC881005.1, SC2018 : MK211374.1, Bat_NP_828854.1 : NP_828854.1, BtRs-BetaCoV/HuB2013 : AIA62312.1, BM48-31/BGR/8 : YP_003858586.1. C. Alors que les premières copies du SRAS-CoV-2 partagent 100 % d'identité sur la protéine E avec ZC45 et ZXC21, les données de séquençage du SRAS-CoV 2 d'avril 2020 indiquent qu'une mutation s'est produite à plusieurs positions. Numéros d'accès des virus : Feb_11 : MN997409, ZC45 : MG772933.1, ZXC21 : MG772934, Apr_13 : MT326139, Apr_15_A : MT263389, Apr_15_B : MT293206, Apr_17 : MT350246. Les alignements ont été effectués à l'aide du serveur Web MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

La protéine E du coronavirus est une protéine structurale qui est intégrée et tapisse l'intérieur de l'enveloppe membranaire du virion²⁶. La protéine E est tolérante aux mutations, comme en témoignent le SRAS (figure 2A) et les coronavirus de chauve-souris apparentés (figure 2B). Cette tolérance aux mutations d'acides aminés de la protéine E est davantage mise en évidence dans la pandémie actuelle de SRAS-CoV-2. Après seulement deux mois de propagation du virus depuis son apparition chez l'homme, les protéines E du SRAS-CoV-2 ont déjà subi des changements mutationnels. Les données de séquence obtenues au cours du mois d'avril révèlent que des mutations se sont produites à quatre endroits différents dans différentes souches (figure 2C). Conformément à cette découverte, l'analyse par explosion de séquences indique qu'à l'exception du SRAS-CoV-2, aucun coronavirus connu ne partage 100 % d'identité de séquence d'acides aminés sur la protéine E avec ZC45/ZXC21 (coronavirus suspects publiés après le début de la pandémie actuelle sont exclus^{18,27-31}). Bien qu'une identité de 100 % sur la protéine E ait été observée entre le SRAS-CoV et certains coronavirus de chauve-souris liés au SRAS, aucune de ces paires ne partage simultanément plus de 83 % d'identité sur la protéine Orf832. Par conséquent, l'identité de 94,2 % sur la protéine Orf8, l'identité de 100 % sur la protéine E et la ressemblance globale au niveau génomique/acide aminé entre le SRAS-CoV-2 et le ZC45/ZXC21 sont très inhabituelles. De telles preuves, lorsqu'elles sont considérées ensemble, sont cohérentes avec une hypothèse selon laquelle le génome du SRAS-CoV-2 a une origine basée sur l'utilisation de ZC45/ZXC21 comme squelette et/ou modèle pour les modifications génétiques de gain de fonction.

Il est important de noter que ZC45 et ZXC21 sont des coronavirus de chauve-souris qui ont été découverts (entre juillet 2015 et février 2017), isolés et caractérisés par des laboratoires de recherche militaire de la troisième université médicale militaire (Chongqing, Chine) et de l'Institut de recherche en médecine du commandement de Nanjing (Nanjing, Chine). Les données et les travaux associés ont été publiés en 2018^{33,34}. De toute évidence, cette épine dorsale/modèle, qui est essentiel pour la création du SRAS-CoV-2, existe dans ces laboratoires de recherche et d'autres apparentés.

Ce qui renforce encore notre affirmation est le virus RaTG13 publié¹⁸, dont la séquence génomique serait identique à 96 % à celle du SRAS-CoV-2. Tout en suggérant une origine naturelle du SRAS CoV-2, le virus RaTG13 a également détourné l'attention du domaine scientifique et du grand public du ZC45/ZXC21^{14,18}. En fait, un laboratoire chinois BSL-3 (le centre clinique de santé publique de Shanghai), qui a publié un article dans Nature faisant état d'une relation phylogénétique étroite conflictuelle entre le SRAS CoV-2 et le ZC45/ZXC21 plutôt qu'avec le RaTG13³⁵, a été rapidement fermé pour "rectification".³⁶ On pense que les chercheurs de ce laboratoire étaient punis pour avoir révélé la connexion SARS-CoV 2-ZC45/ZXC21. D'autre part, des preuves substantielles se sont accumulées, soulignant de graves problèmes associés à la séquence rapportée de RaTG13 et remettant en question l'existence réelle de ce virus de chauve-souris dans la nature^{6,7,19-21}. Une publication très récente a également indiqué que le domaine de liaison au récepteur (RBD) de la protéine Spike du RaTG13 ne pouvait pas lier l'ACE2 de deux types différents de chauves-souris en fer à cheval (elles sont étroitement liées à la chauve-souris en fer à cheval *R. affinis*, l'hôte naturel présumé de RaTG13)

², impliquant l'incapacité de RaTG13 pour infecter les chauves-souris en fer à cheval. Cette découverte confirme davantage la suspicion que la séquence rapportée de RaTG13 aurait pu être fabriquée car la protéine Spike codée par cette séquence ne semble pas porter la fonction revendiquée. Le fait qu'un virus ait été fabriqué pour détourner l'attention du ZC45/ZXC21 témoigne du rôle réel du ZC45/ZXC21 dans la création du SARS-CoV-2.

1.2 Le motif de liaison au récepteur du SARS-CoV-2 Spike ne peut pas naître de la nature et aurait dû être créé par génie génétique

Les protéines Spike décorent l'extérieur des particules de coronavirus. Ils jouent un rôle important dans l'infection car ils interviennent dans l'interaction avec les récepteurs des cellules hôtes et aident ainsi à déterminer la gamme d'hôtes et le tropisme tissulaire du virus. La protéine Spike est divisée en deux moitiés (Figure 3). La moitié avant ou terminale N est nommée S1, qui est entièrement responsable de la liaison au récepteur hôte. Dans les deux SRAS-CoV

et les infections par le SRAS-CoV-2, le récepteur de la cellule hôte est hACE2. Dans S1, un segment d'environ 70 acides aminés établit des contacts directs avec hACE2 et est nommé en conséquence le motif de liaison au récepteur (RBM) (Figure 3C). Dans le SARS-CoV et le SARS-CoV-2, le RBM détermine entièrement l'interaction avec hACE2. La moitié C-terminale de la protéine Spike est nommée S2. La fonction principale de S2 comprend le maintien de la formation de trimères et, lors de clivages successifs de la protéase à la jonction S1/S2 et une position S2' en aval, la médiation de la fusion membranaire pour permettre l'entrée cellulaire du virus.

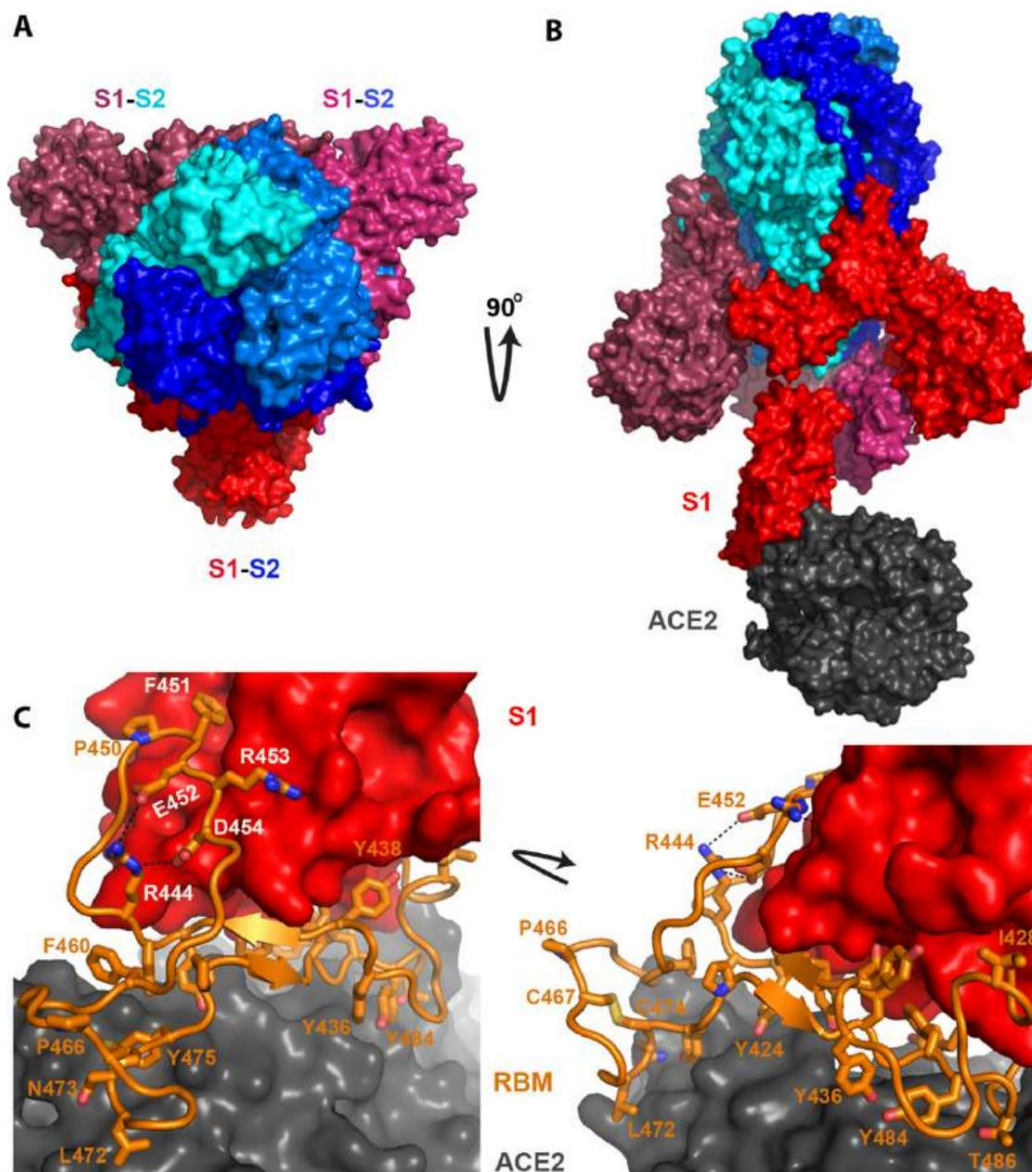


Figure 3. Structure de la protéine SARS Spike et comment elle se lie au récepteur hACE2. Les images ont été générées sur la base de l'ID PDB : 6acj37. A) Trois protéines de pointe, chacune constituée d'une moitié S1 et d'une moitié S2, forment un trimère. B) Les moitiés S2 (nuances de bleu) sont responsables de la formation du trimère, tandis que la partie S1 (nuances de rouge) est responsable de la liaison hACE2 (gris foncé). C) Détails de la liaison entre S1 et hACE2. Le RBM de S1, qui est important et suffisant pour la liaison, est coloré en orange. Les résidus dans le RBM qui sont importants pour l'interaction hACE2 ou le repliement des protéines sont présentés sous forme de bâtons (les numéros de résidus suivent la séquence SARS Spike).

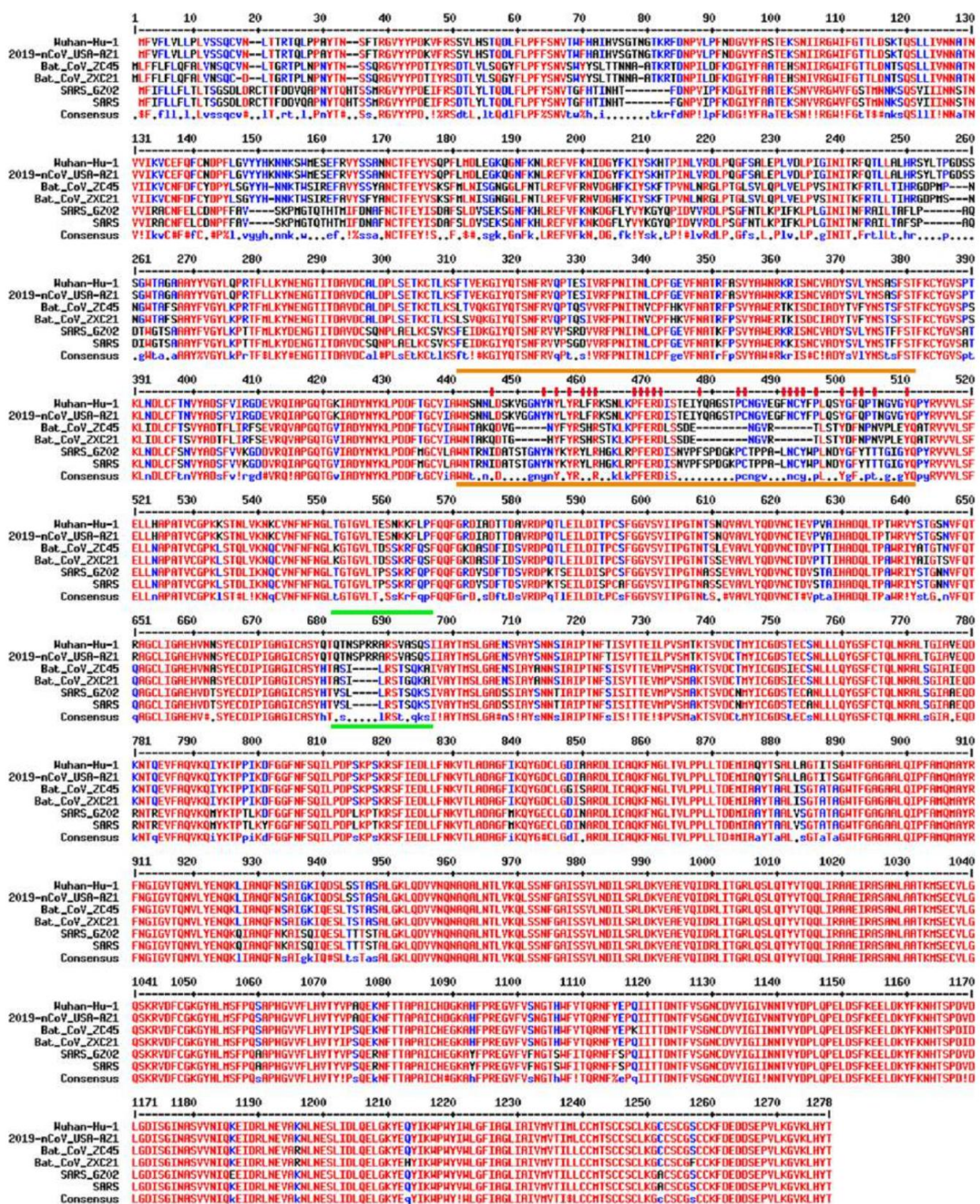


Figure 4. Alignement de séquence des protéines de pointe des coronavirus pertinents. Les virus comparés incluent le SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1 : NC_045512, 2019-nCoV_USA-AZ1 : MN997409), les coronavirus de chauve-souris (Bat_CoV_ZC45 : MG772933, Bat_CoV_ZXC21 : MG772934) et les coronavirus du SRAS (SARS_G202 : AY390556, SARS_04 : 1.3). La région marquée par deux lignes orange est le motif de liaison au récepteur (RBM), qui est important pour l'interaction avec le récepteur hACE2. Les résidus essentiels sont en outre mis en évidence par des bâtons rouges sur le dessus. La région marquée par deux lignes vertes est un site de clivage de la furine qui n'existe que dans le SRAS-CoV-2 mais pas dans aucun autre coronavirus de la lignée B.

Semblable à ce qui est observé pour d'autres protéines virales, S2 de SARS-CoV-2 partage une identité de séquence élevée (95 %) avec S2 de ZC45/ZXC21. À l'opposé, entre le SARS-CoV-2 et le ZC45/ZXC21, la protéine S1, qui dicte quel hôte (humain ou chauve-souris) le virus peut infecter, est beaucoup moins conservée, l'identité de séquence d'acides aminés n'étant que de 69 %.

La figure 4 montre l'alignement des séquences des protéines Spike de six β coronavirus. Deux sont des virus isolés de la pandémie actuelle (Wuhan-Hu-1, 2019-nCoV_USA-AZ1) ; deux sont les virus modèles suspects (Bat_CoV_ZC45, Bat_CoV_ZXC21) ; deux sont des coronavirus du SRAS (SARS_GZ02, SARS). Le RBM est mis en surbrillance entre deux lignes orange. De toute évidence, malgré l'identité de séquence élevée pour l'ensemble des génomes, le RBM du SRAS-CoV-2 diffère considérablement de ceux de ZC45 et ZXC21.

Curieusement, le RBM du SARS-CoV-2 ressemble beaucoup au RBM du SARS Spike. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un "copier-coller" exact, un examen attentif des structures Spike-hACE2^{37,38} révèle que tous les résidus essentiels à la liaison hACE2 ou au repliement des protéines (bâtons oranges sur la figure 3C et ce qui est mis en évidence par des lignes courtes rouges sur la figure 4) sont « conservés ». La plupart de ces résidus essentiels sont préservés avec précision, y compris ceux impliqués dans la formation de liaisons disulfure (C467, C474) et les interactions électrostatiques (R444, E452, R453, D454), qui sont essentielles pour l'intégrité structurale du RBM (Figure 3C et 4). Les quelques changements au sein du groupe de résidus essentiels sont presque exclusivement des "substitutions" hydrophobes (I428àL, L443àF, F460àY, L472àF, Y484àQ), qui ne devraient affecter ni le repliement des protéines ni l'interaction hACE2. Dans le même temps, la majorité des résidus d'acides aminés non essentiels ont « muté » (Figure 4, résidus RBM non marqués par de courtes lignes rouges). À en juger par cette seule analyse de séquence, nous avons été convaincus très tôt que non seulement la protéine SARS-CoV-2 Spike se lierait à hACE2, mais également que la liaison ressemblerait, précisément, à celle entre la protéine SARS Spike originale et hACE2²³. Des travaux structuraux récents ont confirmé notre prédiction³⁹.

Comme expliqué ci-dessous, la façon dont SARS-CoV-2 RBM ressemble à SARS-CoV RBM et le schéma global de conservation de la séquence entre SARS-CoV-2 et ZC45/ZXC21 sont très inhabituels. Collectivement, cela suggère que des parties du génome du SRAS-CoV-2 n'ont pas été dérivées de l'évolution naturelle des particules virales de quasi-espèces.

Si le SRAS-CoV-2 provient bien d'une évolution naturelle, son RBM n'a pu être acquis que dans l'une des deux voies possibles : 1) un événement de recombinaison ancien suivi d'une évolution convergente ou 2) un événement de recombinaison naturelle qui s'est produit assez récemment.

Dans le premier scénario, l'ancêtre du SRAS-CoV-2, un coronavirus de chauve-souris de type ZC45/ZXC21 aurait recombiné et « troqué » son RBM avec un coronavirus porteur d'un RBM relativement « complet » (en référence au SRAS). Cette recombinaison aboutirait à un nouveau coronavirus de type ZC45/ZXC21 avec toutes les lacunes de son RBM « remplies » (Figure 4). Par la suite, le virus devrait s'adapter en profondeur chez son nouvel hôte, où la protéine ACE2 est hautement homologue à hACE2. Des mutations aléatoires à travers le génome auraient dû se produire pour finalement façonner le RBM dans sa forme actuelle - ressemblant au SARS-CoV RBM d'une manière très intelligente. Cependant, ce processus d'évolution convergente entraînerait également l'accumulation d'une grande quantité de mutations dans d'autres parties du génome, rendant l'identité de séquence globale relativement faible. L'identité de séquence élevée entre le SARS-CoV-2 et le ZC45/ZXC21 sur diverses protéines (94-100 % d'identité) ne supporte pas ce scénario et, par conséquent, indique clairement que le SARS-CoV 2 portant un tel RBM ne peut pas provenir d'un ZC45/ Coronavirus de chauve-souris de type ZXC21 par cette voie évolutive convergente.

Dans le deuxième scénario, le coronavirus de type ZC45/ZXC21 aurait dû s'être récemment recombiné et échangé son RBM avec un autre coronavirus qui s'était adapté avec succès pour se lier à un animal ACE2

hautement homologue à hACE2. La probabilité d'un tel événement dépend, en partie, des exigences générales de la recombinaison naturelle : 1) que les deux virus différents partagent une similarité de séquence significative ; 2) qu'ils doivent co-infecter et être présents dans la même cellule du même animal ; 3) que le virus recombinant ne serait pas éliminé par l'hôte ou ne provoquerait pas l'extinction de l'hôte ; 4) que le virus recombinant devrait éventuellement devenir stable et transmissible au sein de l'espèce hôte.

En ce qui concerne ce scénario de recombinaison récent, le réservoir animal ne pourrait pas être les chauves-souris car les protéines ACE2 chez les chauves-souris ne sont pas suffisamment homologues à hACE2 et donc l'adaptation ne serait pas en mesure de produire une séquence RBM comme on le voit dans le SARS-CoV-2. Ce réservoir animal ne pourrait pas non plus être l'homme car le coronavirus de type ZC45/ZXC21 ne pourrait pas infecter l'homme. De plus, il n'y a eu aucune preuve d'un virus SARS-CoV-2 ou SARS-CoV-2 circulant dans la population humaine avant la fin de 2019. Curieusement, selon une récente étude bioinformatique, le SARS-CoV-2 était bien adapté à l'homme depuis le début de l'épidémie¹.

Il ne reste qu'une autre possibilité d'évolution naturelle, à savoir que le virus de type ZC45/ZXC21 et un coronavirus contenant un RBM de type SARS auraient pu se recombiner dans un hôte intermédiaire où la protéine ACE2 est homologue à hACE2. Plusieurs laboratoires ont signalé que certains des pangolins de la Sonde introduits clandestinement en Chine depuis la Malaisie portaient des coronavirus, dont le domaine de liaison aux récepteurs (RBD) est presque identique à celui du SARS-CoV-2^{27-29,31}. Ils ont ensuite suggéré que les pangolins sont l'hôte intermédiaire probable du SARS-CoV-2^{27-29,31}. Cependant, des rapports indépendants récents ont trouvé des failles importantes dans ces données⁴⁰⁻⁴². De plus, contrairement à ces rapports^{27-29,31}, aucun coronavirus n'a été détecté dans les échantillons de pangolins de Sunda collectés depuis plus d'une décennie en Malaisie et à Sabah entre 2009 et 2019⁴³. Une étude récente a également montré que le RBD, qui est partagé entre le SARS-CoV-2 et les coronavirus de pangolin signalés, se lie à hACE2 dix fois plus fort qu'au pangolin ACE2, rejetant davantage les pangolins comme hôte intermédiaire. Une étude *in silico*, tout en faisant écho à l'idée que les pangolins ne sont probablement pas un hôte intermédiaire, a également indiqué qu'aucune des protéines animales ACE2 examinées dans leur étude ne présentait un potentiel de liaison plus favorable à la protéine SARS-CoV-2 Spike que hACE2 ne l'a fait³. Cette dernière étude a pratiquement exempté tous les animaux de leur rôle présumé d'hôte intermédiaire³, ce qui est cohérent avec l'observation selon laquelle le SARS-CoV-2 était bien adapté à l'homme dès le début de l'épidémie¹. Ceci est important car ces découvertes suggèrent collectivement qu'aucun hôte intermédiaire ne semble exister pour le SARS-CoV-2, ce qui diminue à tout le moins la possibilité qu'un événement recombinant se produise chez un hôte intermédiaire.

Même si nous ignorons les preuves ci-dessus qu'aucun hôte approprié n'existe pour que la recombinaison ait lieu et supposons à la place qu'un tel hôte existe, il est encore très peu probable qu'un tel événement de recombinaison puisse se produire dans la nature.

Comme nous l'avons décrit ci-dessus, si l'événement de recombinaison naturelle est responsable de l'apparition du SRAS CoV-2, alors le virus de type ZC45/ZXC21 et un coronavirus contenant un RBM de type SRAS devraient se recombiner dans la même cellule en échangeant le S1 /RBM, qui est une forme rare de recombinaison. De plus, étant donné que le SRAS ne s'est produit qu'une seule fois dans l'histoire de l'humanité, il serait au moins aussi rare que la nature produise un virus qui ressemble au SRAS d'une manière aussi intelligente - ayant un RBM qui ne diffère du RBM du SRAS qu'à quelques points non essentiels. site (Figure 4). La possibilité que ce coronavirus unique de type SRAS réside dans la même cellule que le virus ancêtre de type ZC45/ZXC21 et que les deux virus se recombinent à la manière du « RBM-swapping » est extrêmement faible. Il est important de noter que cet événement, ainsi que l'autre événement de recombinaison décrit ci-dessous dans la section 1.3 (encore plus impossible à produire dans la nature), devraient tous deux se produire pour produire un pic comme on le voit dans le SRAS-CoV-2.

De manière frappante, conformément à la théorie de l'ingénierie RBM, nous avons identifié deux sites de restriction uniques, EcoRI et BstEII, à chaque extrémité du RBM du génome du SRAS-CoV-2, respectivement (Figure 5A). Ces deux sites, qui sont des choix populaires de clonage moléculaire quotidien, n'existent pas dans le reste de ce gène de pointe. Ce paramètre particulier rend extrêmement pratique l'échange de RBM dans le pic, offrant un moyen rapide de tester différents RBM et les protéines Spike correspondantes.

De tels sites EcoRI et BstEII n'existent pas dans les gènes de pointe d'autres coronavirus β , ce qui indique fortement qu'ils n'étaient pas naturels et ont été spécifiquement introduits dans ce gène de pointe du SRAS-CoV-2 pour faciliter la manipulation du RBM critique. Bien que la pointe ZC45 n'ait pas non plus ces deux sites (figure 5B), ils peuvent être introduits très facilement comme décrit dans la partie 2 de ce rapport.

Il est à noter que l'introduction du site EcoRI ici changerait les acides aminés correspondants de -WNT- à -WNS- (Figure 5AB). À notre connaissance, tous les coronavirus de chauve-souris du SRAS et de type SRAS portent exclusivement un résidu T (thréonine) à cet endroit. Le SRAS-CoV-2 est la seule exception dans la mesure où ce T a muté en S (sérine), à l'exception des coronavirus suspects RaTG13 et pangolin publiés après l'épidémie⁴⁸.

Une fois que les sites de restriction ont été introduits avec succès, le segment RBM pourrait être permuté facilement en utilisant la digestion et la ligature des enzymes de restriction de routine. Bien que les techniques de clonage alternatives puissent ne laisser aucune trace de manipulation génétique (l'assemblage de Gibson par exemple), cette approche à l'ancienne pourrait être choisie car elle offre un grand niveau de commodité pour échanger ce RBM critique.

Étant donné que RBM dicte entièrement la liaison hACE2 et que la liaison SARS RBM-hACE2 était entièrement caractérisée par des structures à haute résolution (Figure 3)^{37,38}, cet échange RBM uniquement ne serait pas plus risqué que l'échange Spike complet. En fait, la faisabilité de cette stratégie RBM-swap a été prouvée^{39,47}. En 2008, le groupe du Dr Zhengli Shi a échangé un SRAS RBM dans les protéines Spike de plusieurs coronavirus de chauve-souris de type SRAS après avoir introduit un site de restriction dans un gène de pointe optimisé pour les codons (Figure 5C)⁴⁷. Ils ont ensuite validé la liaison des protéines Spike chimériques résultantes avec hACE2. De plus, dans une publication récente, le RBM du SRAS-CoV-2 a été échangé dans le domaine de liaison au récepteur (RBD) du SRAS CoV, ce qui a donné un RBD chimérique entièrement fonctionnel dans la liaison hACE2 (Figure 5C)³⁹. ~~De manière frappante, dans les deux cas, les segments RBM manipulés ressemblent presque exactement au RBM défini par les positions des sites EcoRI et BstEII (figure 5C).~~ Bien que les détails sur le clonage manquent dans les deux publications^{39,47}, il est concevable que les sites de restriction réels puissent varier en fonction du gène de pointe recevant l'insertion RBM ainsi que de la commodité d'introduire un ou plusieurs sites de restriction uniques dans les régions d'intérêt. Il est à noter que l'auteur correspondant de cette récente publication³⁹, le Dr Fang Li, est un collaborateur actif du Dr Zhengli Shi depuis 2010⁴⁹⁻⁵³. Le Dr Li a été la première personne au monde à avoir élucidé structurellement la liaison entre le SRAS-CoV RBD et hACE2³⁸ et a été le principal expert dans la compréhension structurelle des interactions Spike-ACE2^{38,39,53-56}. La découverte frappante des sites de restriction EcoRI et BstEII à chaque extrémité du SARS-CoV-2 RBM, respectivement, et le fait que la même région RBM a été échangée à la fois par le Dr Shi et par son collaborateur de longue date, respectivement, en utilisant Il est peu probable que les méthodes de digestion par les enzymes de restriction soient une coïncidence. C'est plutôt le pistolet fumant prouvant que le RBM/Spike du SRAS-CoV-2 est le produit d'une manipulation génétique.

Bien qu'il puisse être pratique de copier la séquence exacte de SARS RBM, ce serait un signe trop clair de conception et de manipulation artificielles. L'approche la plus trompeuse serait de changer quelques résidus non essentiels, tout en préservant ceux qui sont critiques pour la liaison. Cette conception pourrait être bien guidée par les structures à haute résolution (Figure 3)^{37,38}. De cette façon, lorsque la séquence globale du RBM apparaîtrait

pour être plus distincte de celle du SARS RBM, la capacité de liaison hACE2 serait bien préservée. Nous croyons que tous les résidus cruciaux (résidus étiquetés avec des bâtons rouges sur la figure 4, qui sont les mêmes résidus montrés dans les bâtons sur la figure 3C) auraient dû être « conservés ». Comme décrit précédemment, alors que certains devraient être une conservation directe, certains auraient dû être remplacés par des résidus ayant des propriétés similaires, ce qui ne perturberait pas la liaison hACE2 et pourrait même renforcer davantage l'association. Il est important de noter que des modifications peuvent avoir été apportées intentionnellement à des sites non essentiels, ce qui les rend moins semblables à un « copier-coller » du SRAS RBM.

1.3 Un site inhabituel de clivage de la furine est présent dans la protéine Spike du SRAS-CoV-2 et est associé à la virulence accrue du virus

Un autre motif unique dans la protéine Spike du SRAS-CoV-2 est un site polybasique de clivage de la furine situé à la jonction S1/S2 (Figure 4, segment entre deux lignes vertes). Un tel site peut être reconnu et clivé par la protéase furine. Au sein de la lignée B des coronavirus β et à l'exception du SRAS CoV-2, aucun virus ne contient de site de clivage de la furine à la jonction S1/S2 (Figure 6) 57. En revanche, un site de clivage de la furine à cet endroit a été observé chez autres groupes de coronavirus^{57,58}. Certaines pressions sélectives semblent être en place qui empêchent la lignée B des coronavirus β d'acquérir ou de maintenir un tel site dans la nature.

Human SARS-CoV BJ01	655 - GICASYHTVSL----RSTS - 670
Human SARS-CoV CUHK-W1	655 - GICASYHTVSL----RSTS - 670
Human SARS-CoV Tor2	655 - GICASYHTVSL----RSTS - 670
Human SARS-CoV Frankfurt-1	655 - GICASYHTVSL----RSTS - 670
Human SARS-CoV Urbani	655 - GICASYHTVSL----RSTS - 670
Civet SARS-CoV civet020	655 - GICASYHTVSL----RSTS - 670
Civet SARS-CoV sz16	655 - GICASYHTVSL----RSTS - 670
Raccoon dog SARS-CoV A030	655 - GICASYHTVSL----RSTS - 670
SARS-CoV-2	669 - GICASYQTQNSPRRSVA - 688
Pangolin CoV MP789	n/a - GICASYQTQNS----RSVS - n/a
Bat SARSr-CoV RaTG13	669 - GICASYQTQNS----RSVA - 684
Bat SARSr-CoV LYRa11	659 - GICASYHTASLL----RNTD - 674
Bat SARSr-CoV LYRa3	659 - GICASYHTASLL----RNTG - 674
Bat SARSr-CoV RsSHC014	656 - GICASYHTVSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs4084	656 - GICASYHTVSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV WIV1	656 - GICASYHTVSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs3367	656 - GICASYHTVSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs7327	656 - GICASYHTVSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs9401	656 - GICASYHTVSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs4231	655 - GICASYHTVSL----RSTS - 670
Bat SARSr-CoV WIV16	655 - GICASYHTVSL----RSTS - 670
Bat SARSr-CoV Rs4874	655 - GICASYHTVSL----RSTS - 670
Bat SARSr-CoV ZC45	646 - GICASYHTASLL----RSTS - 661
Bat SARSr-CoV ZXC21	645 - GICASYHTASLL----RSTG - 660
Bat SARSr-CoV Rf4092	634 - GICASYHTASTL----RGVG - 649
Bat SARSr-CoV Rf/JL2012	636 - GICASYHTASLL----RSTG - 651
Bat SARSr-CoV JTM15	636 - GICASYHTASLL----RSTG - 651
Bat SARSr-CoV 16B0133	636 - GICASYHTASLL----RSTG - 651
Bat SARSr-CoV B15-21	636 - GICASYHTASLL----RSTG - 651
Bat SARSr-CoV YN2013	633 - GICASYHTASTL----RSIG - 648
Bat SARSr-CoV Anlong-103	633 - GICASYHTASTL----RSVG - 648
Bat SARSr-CoV Rp/Shaanxi2011	640 - GICASYHTASVL----RSTG - 655
Bat SARSr-CoV Rs/HuB2013	641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV YNLF/34C	641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV YNLF/31C	641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV Rf1	641 - GICASYHTASHL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV 273	641 - GICASYHTASHL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV Rf/SX2013	639 - GICASYHTASLL----RSTG - 654
Bat SARSr-CoV Rf/HeB2013	641 - GICASYHTASLL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV Cp/Yunnan2011	641 - GICASYHTASLL----RNTG - 656
Bat SARSr-CoV Rs672	641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV Rs4255	641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV 4081	641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV Rm1	641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV 279	641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV Rs/GX2013	642 - GICASYHTASVL----RSTG - 657
Bat SARSr-CoV Rs806	641 - GICASYHTASLL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV HKU3-1	642 - GICASYHTASVL----RSTG - 657
Bat SARSr-CoV Longquan-140	642 - GICASYHTASVL----RSTG - 657
Bat SARSr-CoV Rp3	641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV Rs4247	642 - GICASYHTASTL----RSVG - 657
Bat SARSr-CoV Rs4237	641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV As6526	641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656

Figure 6. Le site de clivage de la furine trouvé à la jonction S1/S2 de Spike est unique au SRAS-CoV-2 et absent dans les autres coronavirus de la lignée B β . Figure reproduite de Hoffmann, et al⁵⁷.

Comme décrit précédemment, lors du processus d'entrée dans la cellule, la protéine Spike est d'abord clivée au niveau de la jonction S1/S2. Cette étape, et un clivage ultérieur en aval qui expose le peptide de fusion, sont tous deux médiés par des protéases hôtes. La présence ou l'absence de ces protéases dans différents types de cellules affecte grandement le tropisme cellulaire et vraisemblablement la pathogénicité de l'infection virale. Contrairement à d'autres protéases, la furine protéase est largement exprimée dans de nombreux types de cellules et est présente à de multiples endroits cellulaires et extracellulaires. Il est important de noter que l'introduction d'un site de clivage de la furine à la jonction S1/S2 pourrait considérablement améliorer l'infektivité d'un virus et étendre considérablement son tropisme cellulaire - un phénomène bien documenté dans les virus de la grippe et d'autres coronavirus⁵⁹⁻⁶⁵.

Si nous laissons de côté le fait qu'aucun site de clivage de la furine ne se trouve dans aucun coronavirus de la lignée B β dans la nature et supposons plutôt que ce site dans le SRAS-CoV-2 est le résultat d'une évolution naturelle, alors une seule voie évolutive est possible, qui est que le site de clivage de la furine doit provenir d'un événement de recombinaison homologue. Plus précisément, un coronavirus β ancêtre ne contenant pas de site de clivage de la furine devrait se recombiner avec un coronavirus étroitement apparenté qui contient un site de clivage de la furine.

Cependant, deux faits défavorisent cette possibilité. Premièrement, bien que certains coronavirus d'autres groupes ou lignées contiennent des sites polybasiques de clivage de la furine, aucun d'entre eux ne contient la séquence polybasique exacte présente dans le SARS-CoV-2 (-PRRAR/SVA-). Deuxièmement, entre le SRAS-CoV-2 et tout coronavirus contenant un site légitime de clivage de la furine, l'identité de séquence sur Spike n'est pas supérieure à 40 %⁶⁶. Un si faible niveau d'identité de séquence exclut la possibilité d'une recombinaison homologue réussie entre les ancêtres de ces virus. Par conséquent, le site de clivage de la furine au sein de la protéine SARS-CoV-2 Spike est peu susceptible d'être d'origine naturelle et devrait plutôt être le résultat d'une modification en laboratoire.

Conformément à cette affirmation, un examen approfondi de la séquence nucléotidique du site de clivage de la furine dans la pointe SARS-CoV-2 a révélé que les deux résidus Arg consécutifs dans la séquence insérée (-PRRA-) sont tous deux codés par le codon rare CGG (codon le moins utilisé pour Arg dans le SARS-CoV-2) (Figure 7)⁸. En fait, cet arrangement CGGCGG est le seul cas trouvé dans le génome du SRAS-CoV-2 où ce codon rare est utilisé en tandem. Cette observation suggère fortement que ce site de clivage de la furine devrait être le résultat du génie génétique. Ajoutant à la suspicion, un site de restriction Faul est formulé par les choix de codons ici, suggérant la possibilité que le polymorphisme de longueur de fragment de restriction, une technique qu'un laboratoire WIV maîtrise⁶⁷, aurait pu être impliqué. Là, le modèle de fragmentation résultant de la digestion de Faul pourrait être utilisé pour surveiller la préservation du site de clivage de la furine dans Spike car ce site de clivage de la furine est sujet aux délétions in vitro^{68,69}. Plus précisément, une RT-PCR sur le gène spike des virus récupérés à partir de cultures cellulaires ou d'animaux de laboratoire pourrait être réalisée, dont le produit serait soumis à une digestion Faul. Les virus conservant ou perdant le site de clivage de la furine produiraient alors des modèles distincts, permettant un suivi pratique du ou des virus d'intérêt.



Figure 7. Deux résidus Arg consécutifs dans l'insertion -PRRA- à la jonction S1/S2 de SARS-CoV-2 Spike sont tous deux codés par un codon rare, CGG. Un site de restriction Faul, 5'-(N)6GCGGG-3', est intégré dans la séquence codante du segment PRRA "inséré", qui peut être utilisé comme marqueur pour surveiller la préservation du site de clivage de la furine introduit.

De plus, bien qu'aucun coronavirus connu ne contienne la séquence exacte de -PRRAR/SVA- qui est présente dans la protéine SARS-CoV-2 Spike, une séquence similaire -RRAR/AR- a été observée à la jonction S1/S2 du Spike protéine dans un coronavirus de rongeur, AcCoV-JC34, qui a été publiée par le Dr Zhengli

Shi en 2017⁷⁰. Il est évident que la légitimité de -RRAR- en tant que site fonctionnel de clivage de la furine est connue des experts du WIV depuis 2017.

Les preuves suggèrent collectivement que le site de clivage de la furine dans la protéine SARS-CoV-2 Spike peut ne pas provenir de la nature et pourrait être le résultat d'une manipulation génétique. Le but de cette manipulation aurait pu être d'évaluer toute amélioration potentielle de l'infectiosité et de la pathogénicité du coronavirus fabriqué en laboratoire⁵⁹⁻⁶⁴. En effet, des études récentes ont confirmé que le site de clivage de la furine confère des avantages pathogènes significatifs au SARS-CoV-2^{57,68}.

1.4 Résumé

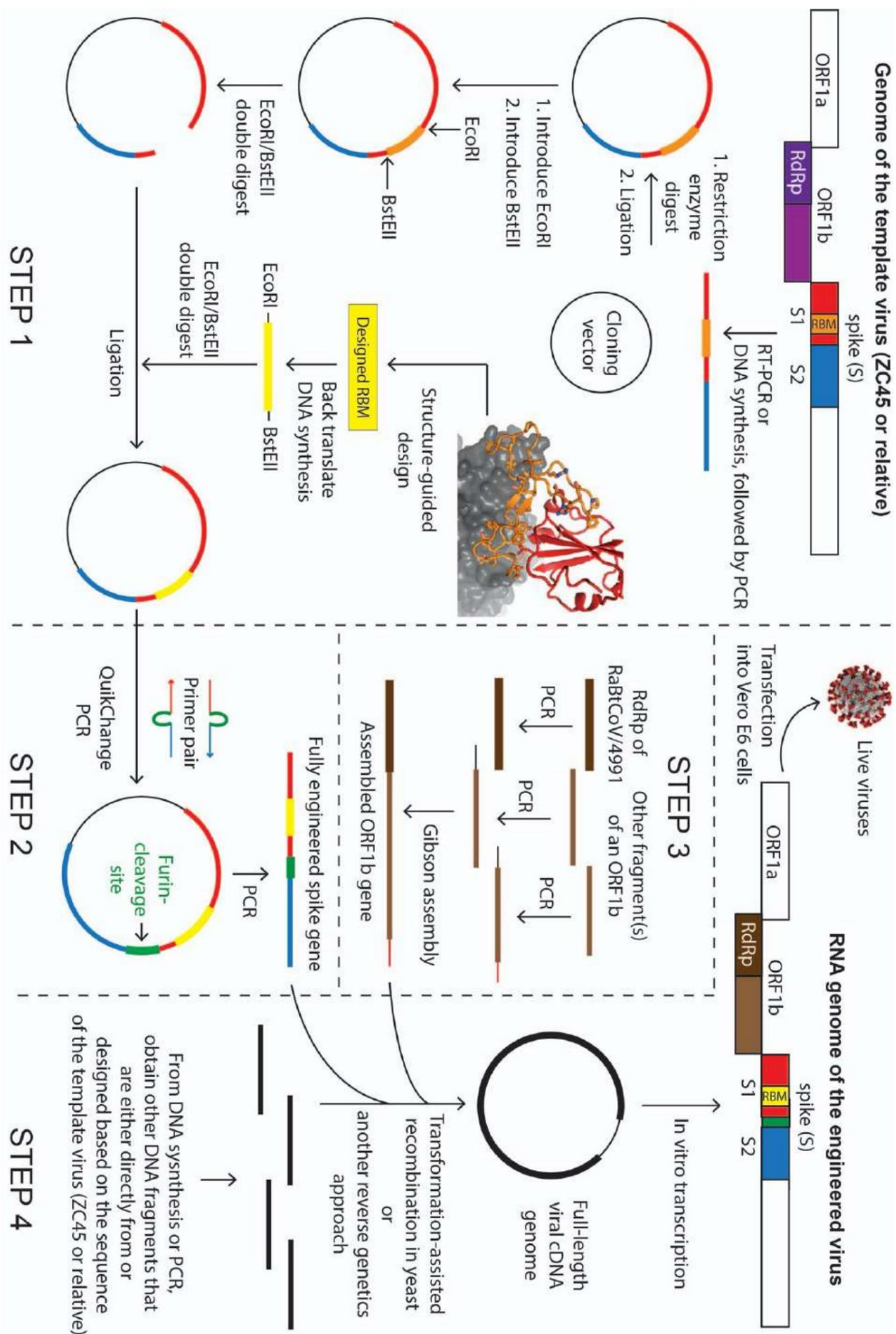
Les preuves présentées dans cette partie révèlent que certains aspects du génome du SRAS-CoV-2 sont extrêmement difficiles à concilier avec le résultat de l'évolution naturelle. La théorie alternative que nous suggérons est que le virus peut avoir été créé en utilisant le ou les coronavirus de chauve-souris ZC45/ZXC21 comme squelette et/ou modèle. La protéine Spike, en particulier le RBM qu'elle contient, aurait dû être artificiellement manipulée, sur laquelle le virus a acquis la capacité de se lier à hACE2 et d'infecter les humains. Ceci est étayé par la découverte d'un site unique de digestion par une enzyme de restriction à chaque extrémité du RBM. Un site inhabituel de clivage de la furine peut avoir été introduit et inséré à la jonction S1/S2 de la protéine Spike, ce qui contribue à l'augmentation de la virulence et de la pathogénicité du virus. Ces transformations ont ensuite mis en scène le virus du SRAS CoV-2 pour qu'il devienne finalement un agent pathogène hautement transmissible, caché au début, mortel, dont les séquelles ne sont pas claires et massivement perturbateur.

De toute évidence, la possibilité que le SRAS-CoV-2 ait pu être créé par gain de fonction manipulations au WIV est importante et doit être étudiée de manière approfondie et indépendante.

2. Délimitation d'une voie de synthèse du SRAS-CoV-2

Dans la deuxième partie de ce rapport, nous décrivons une voie synthétique de création du SRAS-CoV-2 en laboratoire. Il est postulé sur la base d'un support documentaire substantiel ainsi que de preuves génétiques présentes dans le génome du SRAS-CoV-2. Bien que les étapes présentées ici ne doivent pas être considérées comme exactement celles qui ont été prises, nous pensons que les processus clés ne doivent pas être très différents. Surtout, notre travail ici devrait servir de démonstration de la façon dont le SRAS-CoV-2 peut être conçu et créé de manière pratique dans les laboratoires de recherche en suivant des concepts éprouvés et en utilisant des techniques bien établies.

Il est important de noter que les laboratoires de recherche, à la fois à Hong Kong et en Chine continentale, sont à la tête du monde dans la recherche sur les coronavirus, à la fois en termes de ressources et de résultats de recherche. Ce dernier est attesté non seulement par le grand nombre de publications qu'ils ont produites au cours des deux dernières décennies, mais aussi par leurs réalisations marquantes dans le domaine : ils ont été les premiers à identifier les civettes comme hôte intermédiaire du SRAS-CoV et ont isolé le premier souche du virus⁷¹; ils ont été les premiers à découvrir que le SRAS-CoV provenait de chauves-souris^{72,73} ; ils ont révélé pour la première fois l'amélioration dépendante des anticorps (ADE) des infections par le SRAS-CoV⁷⁴ ; ils ont contribué de manière significative à la compréhension du MERS dans tous les domaines (zoonose, virologie et études cliniques)⁷⁵⁻⁷⁹ ; ils ont fait plusieurs percées dans la recherche sur le SRAS-CoV-2^{18,35,80} . Enfin, ils possèdent la plus grande collection de coronavirus au monde (séquences génomiques et virus vivants). Les connaissances, l'expertise et les ressources sont toutes facilement disponibles au sein des laboratoires de recherche de Hong Kong et du continent (ils collaborent étroitement) pour mener à bien et accomplir les travaux décrits ci-dessous.



2.1 Schéma possible dans la conception du laboratoire de création du nouveau coronavirus

Dans cette sous-section, nous décrivons la stratégie globale possible et les principales considérations qui ont pu être formulées au stade de la conception du projet.

Pour concevoir et créer un coronavirus ciblant l'homme, ils devraient choisir un coronavirus de chauve-souris comme modèle/épine dorsale. Cela peut être fait de manière pratique car de nombreux laboratoires de recherche collectent activement des coronavirus de chauve-souris au cours des deux dernières décennies^{32,33,70,72,81-85}. Cependant, ce virus modèle ne devrait idéalement pas provenir des collections du Dr Zhengli Shi, étant donné qu'elle est largement connue pour avoir été engagée dans des études de gain de fonction sur les coronavirus. Par conséquent, ZC45 et/ou ZXC21, de nouveaux coronavirus de chauve-souris découverts et détenus par des laboratoires militaires³³, conviendraient comme matrice/épine dorsale. Il est également possible que ces laboratoires militaires aient découvert d'autres virus étroitement apparentés au même endroit et en aient gardé certains inédits. Par conséquent, le modèle réel pourrait être ZC45 ou ZXC21, ou un proche parent d'entre eux. La voie postulée décrite ci-dessous serait la même, quel que soit le modèle réel parmi les trois.

Une fois qu'ils ont choisi un virus modèle, ils doivent d'abord concevoir, par clonage moléculaire, la protéine Spike afin qu'elle puisse se lier à hACE2. Le concept et les techniques de clonage impliqués dans cette manipulation ont été bien documentés dans la littérature^{44-46,84,86}. Avec presque aucun risque d'échec, le virus de la chauve-souris modèle pourrait alors être converti en un coronavirus capable de se lier à l'hACE2 et d'infecter les humains⁴⁴⁻⁴⁶.

Deuxièmement, ils utiliseraient le clonage moléculaire pour introduire un site de clivage de la furine à la jonction S1/S2 de Spike. Cette manipulation, basée sur des connaissances connues^{60,61,65}, produirait probablement une souche de coronavirus plus infectieuse et pathogène.

Troisièmement, ils produiraient une construction de gène ORF1b. Le gène ORF1b code pour la polyprotéine Orf1b, qui est traitée après la traduction pour produire des protéines virales individuelles : ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp), hélicase, guanidine-N7 méthyltransférase, endoribonucléase spécifique de l'uridylate et 2'-O-méthyltransférase. Toutes ces protéines font partie de la machinerie de réplication du virus. Parmi eux, la protéine RdRp est la plus cruciale et est hautement conservée parmi les coronavirus. Il est important de noter que le laboratoire du Dr Zhengli Shi utilise un protocole PCR, qui amplifie un fragment particulier du gène RdRp, comme méthode principale pour détecter la présence de coronavirus dans des échantillons bruts (échange fécal de chauve-souris, excréments, etc.). À la suite de cette pratique, le groupe Shi a documenté les informations de séquence de ce court segment de RdRp pour tous les coronavirus qu'ils ont détectés et/ou collectés avec succès.

Ici, la manipulation génétique est moins exigeante ou compliquée car Orf1b est conservé et probablement Orf1b de n'importe quel coronavirus β serait suffisamment compétent pour faire le travail. Cependant, nous pensons qu'ils voudraient introduire un Orf1b particulier dans le virus pour l'une des deux raisons possibles :

1. Étant donné que de nombreuses analyses phylogénétiques classent les coronavirus en fonction de la similarité de séquence du gène RdRp uniquement^{18,31,35,83,87}, le fait d'avoir un RdRp différent dans le génome pourrait donc garantir que le SRAS-CoV-2 et le ZC45/ZXC21 sont séparés en différents groupes/sous-lignées dans les études phylogénétiques. Cependant, le choix d'un gène RdRp est pratique car la courte séquence de segments RdRp a été enregistrée pour tous les coronavirus jamais collectés/détectés. Leur choix final était la séquence RdRp du coronavirus de chauve-souris RaBtCoV/4991, qui a été découverte en 2013. Pour RaBtCoV/4991, la seule information jamais publiée était la séquence de son court segment RdRp⁸³, alors que ni sa séquence génomique complète ni l'isolement du virus n'ont jamais été rapportés. . Après avoir amplifié le segment RdRp (ou l'ensemble du gène ORF1b) de RaBatCoV/4991, ils l'auraient ensuite utilisé pour l'assemblage et la création ultérieurs du génome du SARS-CoV-2. Petits changements dans le RdRp

La séquence peut soit être introduite au début (par synthèse d'ADN) soit être générée via des passages plus tard. Sur une piste distincte, lorsqu'ils étaient engagés dans la fabrication de la séquence RaTG13, ils auraient pu commencer avec le court segment RdRp de RaBtCoV/4991 sans introduire de modifications dans sa séquence, résultant en une identité de séquence nucléotidique à 100 % entre les deux virus. sur ce court segment RdRp83 . On pourrait alors prétendre que ce virus RaTG13 a été découvert en 2013.

2. La protéine RdRp de RaBatCoV/4991 est unique en ce sens qu'elle est supérieure à la RdRp de tout autre coronavirus β pour le développement de médicaments antiviraux. RdRp n'a pas d'homologues dans les cellules humaines, ce qui fait de cette enzyme virale essentielle une cible hautement souhaitable pour le développement d'antiviraux. A titre d'exemple, le Remdesivir, qui fait actuellement l'objet d'essais cliniques, cible le RdRp. Lors de la création d'un nouveau virus ciblant l'homme, ils seraient également intéressés par le développement de l'antidote. Même si la découverte de médicaments comme celle-ci peut ne pas être facilement réalisée, il est raisonnable pour eux d'incorporer intentionnellement un RdRp qui se prête mieux au développement de médicaments antiviraux.

Quatrièmement, ils utiliseraient la génétique inverse pour assembler les fragments de gène de la pointe, ORF1b, et le reste du modèle ZC45 dans une version ADNc du génome viral. Ils effectueraient ensuite une transcription in vitro pour obtenir le génome de l'ARN viral. La transfection du génome ARN dans des cellules permettrait la récupération de virus vivants et infectieux avec le génome artificiel souhaité.

Cinquièmement, ils procéderaient à la caractérisation et à l'optimisation de la ou des souches virales pour améliorer l'aptitude, l'infectivité et l'adaptation globale à l'aide de passages en série in vivo. Une ou plusieurs souches virales répondant à certains critères seraient alors obtenues comme produit(s) final(aux).

2.2 Une voie synthétique postulée pour la création du SRAS-CoV-2

Dans cette sous-section, nous décrivons plus en détail comment chaque étape pourrait être réalisée en laboratoire en utilisant les matériaux disponibles et les techniques moléculaires, cellulaires et virologiques de routine. Un schéma de ce processus est illustré à la figure 8. Nous estimons que l'ensemble du processus pourrait être achevé en environ 6 mois.

Étape 1 : Ingénierie du RBM du Spike pour la liaison hACE2 (1,5 mois)

La protéine Spike d'un coronavirus de chauve-souris est incapable ou inefficace de se lier à hACE2 en raison de l'absence de résidus importants dans son RBM. Cela peut être illustré par le RBM du virus matrice ZC45 (figure 4). La première et la plus critique étape de la création du SRAS-CoV-2 consiste à concevoir le Spike afin qu'il acquière la capacité de se lier au hACE2. Comme en témoigne la littérature, de telles manipulations ont été effectuées à plusieurs reprises dans des laboratoires de recherche depuis 2008^{44,46,88,89}. Bien qu'il existe de nombreuses façons possibles de concevoir la protéine Spike, nous pensons que ce qui a été réellement entrepris était de remplacer le RBM d'origine par un RBM conçu et éventuellement optimisé en utilisant le RBM du SRAS comme guide. Comme décrit dans la partie 1, cette théorie est étayée par notre observation selon laquelle deux sites de restriction uniques, EcoRI et BstEII, existent à chaque extrémité du RBM dans le génome du SRAS-CoV-2 (Figure 5A) et par le fait que de tels RBM- swap a été réalisé avec succès par le Dr Zhengli Shi et par son collaborateur de longue date et expert en biologie des structures, le Dr Fang Li^{39,47}.

Bien que la pointe ZC45 ne contienne pas ces deux sites de restriction (figure 5B), ils peuvent être introduits très facilement. Le gène de pointe d'origine serait soit amplifié par RT-PCR, soit obtenu par synthèse d'ADN (certains changements pourraient être introduits en toute sécurité dans certaines régions variables de la séquence) suivi d'une PCR. Le gène serait ensuite cloné dans un plasmide en utilisant des sites de restriction autres que EcoRI et BstEII.

Une fois dans le plasmide, le gène de pointe peut être modifié facilement. Tout d'abord, un site EcoRI peut être introduit en convertissant la séquence "gaacac" en surbrillance (figure 5B) en "gaattc" souhaité (figure 5A). La différence entre eux sont deux nucléotides consécutifs. En utilisant le kit de mutagenèse dirigée QuikChange disponible dans le commerce, une telle mutation dinucléotidique peut être générée en une semaine maximum.

Par la suite, le site BstEII pourrait être introduit de manière similaire à l'autre extrémité du RBM. Plus précisément, la séquence "gaatacc" (figure 5B) serait convertie en "gggtacc" souhaité (figure 5A), ce qui nécessiterait de la même manière une semaine de temps.

Une fois que ces sites de restriction, qui sont uniques dans le gène de pointe du SRAS-CoV-2, ont été introduits avec succès, différents segments RBM pourraient être échangés facilement et la protéine Spike résultante évaluée par la suite à l'aide de tests établis.

Comme décrit dans la partie 1, la conception d'un segment RBM pourrait être bien guidée par les structures à haute résolution (Figure 3) 37,38, produisant une séquence qui ressemble au SRAS RBM d'une manière intelligente. Lors de la réalisation de la conception guidée par la structure du RBM, ils auraient suivi la routine et généré quelques (par exemple une douzaine) de ces RBM dans l'espoir que certaines variantes spécifiques puissent être supérieures à d'autres dans la liaison de hACE2. Une fois la conception terminée, ils pourraient faire synthétiser commercialement chacun des gènes RBM conçus (rapide et très abordable) avec un site EcoRI à l'extrémité 5' et un site BstEII à l'extrémité 3'. Ces nouveaux gènes RBM pourraient ensuite être clonés dans le gène de pointe, respectivement. La synthèse des gènes et le clonage ultérieur, qui pourraient être effectués en mode batch pour la petite bibliothèque de RBM conçus, prendraient environ un mois.

Ces protéines Spike modifiées pourraient ensuite être testées pour la liaison hACE2 à l'aide des tests d'infection virale de pseudotype établis^{45,49,50}. Le Spike conçu avec des affinités de liaison bonnes à exceptionnelles serait sélectionné. (Bien que cela ne soit pas nécessaire, une évolution dirigée pourrait être impliquée ici (PCR sujette aux erreurs sur le gène RBM), couplée à un test de liaison in vitro^{39,90} ou à un test d'infection virale pseudotype^{45,49,50}, pour obtenir un RBM qui se lie à hACE2 avec une affinité exceptionnelle.)

Compte tenu de l'abondance de la littérature sur l'ingénierie Spike^{44-46,84,86} et des structures haute résolution disponibles du complexe Spike-hACE^{237,38}, le succès de cette étape serait tout à fait garanti. À la fin de cette étape, comme souhaité, un nouveau gène de pointe serait obtenu, qui code pour une nouvelle protéine Spike capable de se lier à hACE2 avec une affinité élevée.

Étape 2 : Ingénierie d'un site de clivage de la furine à la jonction S1/S2 (0.5 mois)

Le produit de l'étape 1, un plasmide contenant la pointe d'ingénierie, serait encore modifié pour inclure un site de clivage de la furine (segment indiqué par des lignes vertes sur la figure 4) à la jonction S1/S2. Cette courte séquence de séquences de gènes peut être facilement insérée à l'aide de plusieurs techniques de clonage de routine, notamment la PCR dirigée sur le site QuikChange⁶⁰, la PCR de chevauchement suivie d'une digestion par des enzymes de restriction et d'une ligation⁹¹, ou l'assemblage de Gibson. Aucune de ces techniques ne laisserait de trace dans la séquence. Quelle que soit la méthode de clonage choisie, le morceau de gène inséré serait inclus dans les amorces, qui seraient conçues, synthétisées et utilisées dans le clonage. Cette étape, conduisant à un nouveau Spike modifié avec le site de clivage de la furine ajouté à la jonction S1/S2, pourrait être achevée en moins de deux semaines.

Étape 3 : Obtenir un gène ORF1b qui contient la séquence du segment RdRp court de RaBtCoV/4991 (1 mois, mais peut être réalisé en même temps que les étapes 1 et 2)

Contrairement à l'ingénierie de Spike, aucune conception compliquée n'est nécessaire ici, sauf que le segment de gène RdRp de RaBtCoV/4991 devrait être inclus. L'assemblage Gibson aurait pu être utilisé ici. Dans cette technique, plusieurs fragments, chaque paire adjacente partageant un chevauchement de 20 à 40 pb, sont combinés ensemble dans une réaction simple pour assembler un long produit d'ADN. Deux ou trois fragments, chacun couvrant une section significative du gène ORF1b, seraient sélectionnés sur la base de séquences connues de coronavirus de chauve-souris. L'un de ces fragments serait le segment RdRp de RaBtCoV/499183. Chaque fragment serait amplifié par PCR avec des régions de chevauchement appropriées introduites dans les amorces. Enfin, tous les fragments purifiés seraient regroupés à des concentrations équimolaires et ajoutés au mélange réactionnel de Gibson, ce qui, après une courte incubation, donnerait le gène ORF1b souhaité dans son ensemble.

Étape 4 : Produire le génome viral conçu en utilisant la génétique inverse et récupérer les virus vivants (0,5 mois)

La génétique inverse a été fréquemment utilisée pour assembler des génomes viraux entiers, y compris des génomes de coronavirus^{67,92-96}. L'exemple le plus récent est la reconstruction du génome du SRAS-CoV-2 à l'aide de la recombinaison assistée par transformation dans la levure⁹⁷. Grâce à cette méthode, le groupe suisse a assemblé l'intégralité du génome viral et produit des virus vivants en une semaine seulement⁹⁷. Cette technique efficace, qui ne laisserait aucune trace de manipulation artificielle dans le génome viral créé, est disponible depuis 2017^{98,99}. En plus du gène de pointe modifié (des étapes 1 et 2) et du gène ORF1b (de l'étape 3), d'autres fragments couvrant le reste du génome seraient obtenus soit par amplification RT-PCR à partir du virus matrice, soit par synthèse d'ADN par suivant une séquence légèrement modifiée par rapport à celle du virus matrice. Nous pensons que cette dernière approche était plus probable car elle permettrait des changements de séquence introduits dans les régions variables de protéines moins conservées, dont le processus pourrait être facilement guidé par des alignements de séquences multiples. Les séquences d'acides aminés de fonctions plus conservées, telles que celle de la protéine E, pourraient avoir été laissées inchangées. Tous les fragments d'ADN seraient alors regroupés et transformés en levure, où la version ADNc du génome du SRAS-CoV-2 serait assemblée via une recombinaison assistée par transformation. Bien sûr, une méthode alternative de génétique inverse, dont l'une a été utilisée avec succès par le WIV dans le passé⁶⁷, pourrait également être employée^{67,92-96,100}. Bien que certaines approches antérieures de génétique inverse puissent laisser des sites de restriction où différents fragments seraient joints, ces traces seraient difficiles à détecter car le site exact de ligature peut se trouver n'importe où dans le génome d'environ 30 kb. Quoi qu'il en soit, une version ADNc du génome viral serait obtenue à partir de l'expérience de génétique inverse.

Par la suite, la transcription in vitro utilisant l'ADNc comme matrice donnerait le génome de l'ARN viral, qui, lors de la transfection dans des cellules Vero E6, permettrait la production de virus vivants portant toutes les propriétés conçues.

Étape 5 : Optimiser le virus pour sa forme physique et améliorer son affinité de liaison hACE2 in vivo (2,5 à 3 mois)

Le virus récupéré à l'étape 4 doit être adapté davantage en subissant l'expérience classique - passage en série chez des animaux de laboratoire¹⁰¹. Cette dernière étape validerait l'aptitude du virus et assurerait son adaptation orientée récepteur vers son hôte prévu, qui, selon les analyses ci-dessus, devrait être humain.

Surtout, le RBM et le site de clivage de la furine, qui ont été introduits séparément dans la protéine Spike, seraient désormais optimisés ensemble comme une seule unité fonctionnelle. Parmi les différents modèles animaux disponibles (par exemple, les souris, les hamsters, les furets et les singes) pour les coronavirus, les souris transgéniques hACE2 (hACE2-souris) devraient être le choix le plus approprié et le plus pratique ici. Ce modèle animal a été établi lors de l'étude du SARS-CoV et est disponible au Jackson Laboratory depuis de nombreuses années¹⁰²⁻¹⁰⁴.

La procédure de passage en série est simple. En bref, la souche virale sélectionnée à l'étape 4, un précurseur du SRAS-CoV-2, serait inoculée par voie intranasale à un groupe de souris hACE2 anesthésiées.

Environ 2 à 3 jours après l'infection, le virus dans les poumons s'amplifie généralement jusqu'à un titre maximal. Les souris feraient

puis être sacrifié et les poumons homogénéisés. Habituellement, le surnageant de poumon de souris, qui porte la charge virale la plus élevée, serait utilisé pour extraire le virus candidat pour le prochain cycle de passage. Après environ 10 à 15 cycles de passage, l'affinité de liaison au hACE2, l'efficacité de l'infection et la létalité de la souche virale seraient suffisamment améliorées et le génome viral stabilisé¹⁰¹. Enfin, après une série d'expériences de caractérisation (par exemple, test de cinétique virale, test de réponse des anticorps, observation des symptômes et examen de la pathologie), le produit final, le SARS-CoV-2, serait obtenu, concluant l'ensemble du processus de création. À partir de ce moment, ce pathogène viral pourrait être amplifié (très probablement à l'aide de cellules Vero E6) et produit en routine.

Il est à noter que, sur la base des travaux effectués sur le SARS-CoV, la souris hACE2, bien que adaptée à l'adaptation au SARS-CoV-2, n'est pas un bon modèle pour refléter la transmissibilité du virus et les symptômes cliniques associés chez l'homme. Nous pensons que ces scientifiques n'ont peut-être pas utilisé un modèle animal approprié (comme le hamster doré syrien) pour tester la transmissibilité du SRAS-CoV-2 avant l'épidémie de COVID-19. S'ils avaient fait cette expérience avec un modèle animal approprié, la nature hautement contagieuse du SRAS-CoV-2 serait extrêmement évidente et, par conséquent, le SRAS-CoV-2 n'aurait pas été décrit comme "ne causant pas de transmission interhumaine" à le début de l'éclosion.

Nous supposons également que l'adaptation extensive en laboratoire, qui est orientée vers une transmissibilité et une létalité accrues, a peut-être poussé le virus trop loin. En conséquence, le SRAS-CoV-2 pourrait avoir perdu la capacité d'atténuer à la fois la transmissibilité et la létalité lors de son adaptation actuelle dans la population humaine. Cette hypothèse est cohérente avec l'absence d'atténuation apparente du SRAS-CoV-2 jusqu'à présent malgré sa grande prévalence et avec l'observation qu'une variante prédominante récemment apparue ne montre qu'une transmissibilité améliorée¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

Le passage en série est un processus rapide et intensif, où l'adaptation du virus est accélérée. Bien que destiné à imiter l'évolution naturelle, le passage en série est beaucoup plus limité dans le temps et à l'échelle. En conséquence, moins de mutations aléatoires seraient attendues dans les passages en série que dans l'évolution naturelle. Ceci est particulièrement vrai pour les protéines virales conservées, telles que la protéine E. Critique dans la réplication virale, la protéine E est un déterminant de la virulence et son ingénierie peut rendre le SARS-CoV-2 atténué¹⁰⁹⁻¹¹¹. Par conséquent, au stade initial de l'assemblage, ces scientifiques auraient pu décider de conserver la séquence d'acides aminés de la protéine E inchangé par rapport à celui du ZC45/ZXC21. En raison de la nature conservée de la protéine E et des limites du passage en série, aucune mutation d'acide aminé ne s'est réellement produite, entraînant une identité de séquence de 100 % sur la protéine E entre le SARS-CoV-2 et ZC45/ZXC21. La même chose aurait pu arriver aux marques de clonage moléculaire (sites de restriction flanquant le RBM). Le passage en série, qui aurait dû partiellement naturaliser le génome du SRAS-CoV-2, n'aurait peut-être pas supprimé tous les signes de manipulation artificielle.

3. Remarques finales

De nombreuses questions restent sans réponse sur l'origine du SARS-CoV-2. D'éminents virologues ont impliqué dans une lettre de Nature Medicine qu'une fuite en laboratoire, bien qu'elle ne soit pas entièrement exclue, était peu probable et qu'aucun signe de manipulation génétique n'est présent dans le génome du SRAS-CoV-24. Cependant, nous montrons ici que des preuves génétiques dans le gène de pointe du génome du SRAS-CoV-2 (sites de restriction flanquant le RBM ; codons rares en tandem utilisés au site de clivage de la furine inséré) existent et suggèrent que le génome du SRAS-CoV-2 devrait être le produit d'une manipulation génétique. De plus, les concepts éprouvés, les techniques bien établies, les connaissances et l'expertise sont tous en place pour la création pratique de ce nouveau coronavirus en peu de temps.

Les motifs mis à part, les faits suivants concernant le SRAS-CoV-2 sont bien étayés : 1. S'il

s'agissait d'un produit de laboratoire, l'élément le plus critique dans sa création, le virus dorsal/modèle (ZC45/ZXC21), appartient à des laboratoires de recherche militaires.

2. La séquence du génome du SRAS-CoV-2 a probablement subi une manipulation génétique, grâce à laquelle le virus a acquis la capacité de cibler les humains avec une virulence et une infectiosité accrues.

3. Les caractéristiques et les effets pathogènes du SRAS-CoV-2 sont sans précédent. Le virus est hautement transmissible, caché au début, ciblant plusieurs organes, séquelles peu claires, mortel et associé à divers symptômes et complications.

4. Le SRAS-CoV-2 a provoqué une pandémie mondiale, faisant des centaines de milliers de morts et fermant vers le bas de l'économie mondiale. Il a un pouvoir destructeur comme aucun autre.

À en juger par les preuves que nous et d'autres avons recueillies, nous pensons que la recherche de l'origine du SRAS-CoV-2 devrait impliquer un audit indépendant des laboratoires WIV P4 et des laboratoires de leurs proches collaborateurs. Une telle enquête aurait dû avoir lieu il y a longtemps et ne devrait plus être retardée.

On note également que dans la publication du virus chimérique SHC015-MA15 en 2015, l'attribution du financement de Zhengli Shi par le NIAID a été initialement omise. Il a été réintégré dans la publication en 2016 dans un corrigendum, peut-être après la réunion de janvier 2016 pour rétablir le financement des NIH pour la recherche sur le gain de fonction sur les virus. Il s'agit d'un comportement scientifique inhabituel, qui nécessite une explication.

Ce qui n'est pas décrit en détail dans ce rapport, ce sont les diverses preuves indiquant que plusieurs coronavirus récemment publiés (RaTG1318, RmYN0230 et plusieurs coronavirus de pangolin27-29,31) sont très suspects et probablement frauduleux. Ces fabrications ne serviraient à rien d'autre qu'à tromper la communauté scientifique et le grand public afin que la véritable identité du SRAS-CoV-2 soit cachée.

Bien que l'exclusion des détails de ces preuves ne modifie pas la conclusion du rapport actuel, nous pensons que ces détails fourniraient un soutien supplémentaire à notre affirmation selon laquelle le SRAS-CoV-2 est un virus amélioré en laboratoire et un produit de gain de- recherche de fonction. Un rapport de suivi axé sur ces preuves supplémentaires est en cours de préparation et sera soumis sous peu.

Remerciements

Nous tenons à remercier Daoyu Zhang pour avoir partagé avec nous les découvertes de mutations dans les protéines E dans différents sous-groupes de β coronavirus. Nous remercions également tous les scientifiques anonymes et autres personnes, qui ont contribué à découvrir divers faits associés à l'origine du SRAS-CoV-2.

Références:

1. Zhan, SH, Deverman, BE & Chan, YA Le SRAS-CoV-2 est bien adapté aux humains. Qu'est-ce que cela signifie pour la réémergence? bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.073262> (2020).
2. Mou, H. et al. Les mutations des orthologues ACE2 de chauve-souris améliorent considérablement la neutralisation ACE2-Fc du SRAS CoV-2. bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2020.06.29.178459> (2020).
3. Piplani, S., Singh, PK, Winkler, DA et Petrovsky, N. Comparaison in silico des affinités de liaison de la protéine de pointe-ACE2 entre les espèces ; importance pour l'origine possible du virus SARS-CoV-2. arXiv, arXiv:2005.06199 (2020).
4. Andersen, KG, Rambaut, A., Lipkin, WI, Holmes, EC et Garry, RF L'origine proximale du SRAS CoV-2. Nat Med 26, 450-452 (2020).

5. Maiti, AK sur l'origine du virus SARS-CoV-2. Préimpression (authorea.com), DOI : 10.22541/au.159355977.76503625 (2020).
6. Lin, X. & Chen, S. Préoccupations majeures concernant l'identification de la souche de coronavirus de chauve-souris RaTG13 et la qualité du papier de nature connexe. Prépublications, 2020060044 (2020).
7. Bengston, D. Tous les articles de revues évaluant l'origine ou l'épidémiologie du SRAS-CoV-2 qui utilisent la génomique de la souche de chauve-souris RaTG13 sont potentiellement défectueux et doivent être rétractés. OSFPreprints, DOI : 10.31219/osf.io/wy89d (2020).
8. Segreto, R. & Deigin, Y. Considérer une origine de manipulation génétique pour le SRAS-CoV-2 est-il une théorie du complot qui doit être censurée ? Préimpression (Researchgate) DOI : 10.13140/RG.2.2.31358.13129/1 (2020).
9. Rahalkar, MC & Bahulikar, RA Comprendre l'origine de 'BatCoV-RaTG13', un virus le plus proche du SARS-CoV-2. Prépublications, 2020050322 (2020).
- dix. Robinson, C. Le virus COVID-19 a-t-il été génétiquement modifié ? (https://gmwatch.org/en/news/dernières-nouvelles/19383_2020).
11. Robinson, C. Un autre expert conteste les affirmations selon lesquelles le SRAS-CoV-2 n'a pas été génétiquement modifié. (https://gmwatch.org/en/news/latest-news/19383_2020).
12. Sørensen, B., Dalgleish, A. & Susrud, A. Les preuves qui suggèrent qu'il ne s'agit pas d'un virus naturellement évolué. Préimpression, <https://www.minervanett.no/files/2020/07/13/TheEvidenceNoNaturalEvol.pdf> (2020).
13. Zhang, B. Le SRAS-CoV-2 pourrait provenir d'un laboratoire - Une critique de "l'origine proximale du SRAS-CoV-2" Publié dans Nature Medicine. (https://www.linkedin.com/pulse/sars-cov-2-could-come-from-lab-critique-proximal-origin-billy-zhang?articleId=6651628681431175168#comments.6651628681431175168&trk=public_profile_article_view, 2020).
14. Sirotkin, K. & Sirotkin, D. Le SRAS-CoV-2 pourrait-il être apparu via un passage en série à travers un hôte animal ou une culture cellulaire ? BioEssays, <https://doi.org/10.1002/bies.202000091> (2020).
15. Seyran, M. et al. Questions concernant l'origine proximale du SRAS-CoV-2. J Med Virol (2020).
16. La Chine rend hommage à Ian Lipkin. (<https://www.publichealth.columbia.edu/public-health-now/news/china-honors-ian-lipkin>, 2020).
17. Holmes, E. CV universitaire. (<https://www.sydney.edu.au/AcademicProfiles/profile/resource?urlid=edward.holmes&type=cv>, 2020).
18. Zhou, P. et al. Une épidémie de pneumonie associée à un nouveau coronavirus d'origine probable de chauve-souris. Nature (2020).
19. Rahalkar, M. & Bahulikar, R. La nature anormale de l'échantillon d'écouvillon fécal utilisé pour l'analyse NGS de la séquence du génome RaTG13 pose une question sur l'exactitude de la séquence RaTG13. Preprints.org, 2020080205 (2020).
20. Singla, M., Ahmad, S., Gupta, C. & Sethi, T. L'assemblage De-novo du génome RaTG13 révèle des incohérences obscurcissant davantage les origines du SARS-CoV-2. Prépublications, 2020080595 (doi : 10.20944/preprints202008.0595.v1) (2020).
21. Zhang, D. Anomalies dans le séquençage et la provenance du BatCoV/RaTG13. Préimpression (zenodo.org), https://zenodo.org/record/3987503#_Xz9GzC-z3GI (2020).
22. Robinson, C. Journals théorie de l'origine du laboratoire de censure pour le SRAS-CoV-2. (<https://www.gmwatch.org/en/news/latest-news/19475-journals-censor-lab-origin-theory-for-sars-cov-2>, 2020).
23. Preuves scientifiques et logique derrière l'affirmation selon laquelle le coronavirus de Wuhan est d'origine humaine. <https://nerdhaspower.weebly.com> (2020).
24. Zhang, Y. et al. La protéine ORF8 du SRAS-CoV-2 assure la médiation de l'évasion immunitaire en régulant fortement à la baisse le CMH-I. bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2020.05.24.111823> (2020).
25. Muth, D. et al. Atténuation de la réplication par une délétion de 29 nucléotides dans le coronavirus du SRAS acquis au cours des premiers stades de la transmission interhumaine. Sci Rep 8, 15177 (2018).
26. Schoeman, D. & Fielding, BC Protéine d'enveloppe du coronavirus : connaissances actuelles. Virol J 16, 69 (2019).
27. Lam, TT et al. Identification des coronavirus liés au SRAS-CoV-2 chez les pangolins malais. Nature (2020).
28. Liu, P. et al. Les pangolins sont-ils l'hôte intermédiaire du nouveau coronavirus 2019 (SARS-CoV-2) ? PLoS Pathog 16, e1008421 (2020).
29. Xiao, K. et al. Isolement du coronavirus lié au SRAS-CoV-2 des pangolins malais. Nature (2020).

30. Zhou, H. et al. Un nouveau coronavirus de chauve-souris étroitement lié au SRAS-CoV-2 contient des insertions naturelles au site de clivage S1/S2 de la protéine de pointe. *Curr Biol* 30, 2196-2203 e3 (2020).
31. Zhang, T., Wu, Q. & Zhang, Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID 19 Outbreak. *Curr Biol* 30, 1578 (2020).
32. Yang, XL et al. Isolement et caractérisation d'un nouveau coronavirus de chauve-souris étroitement lié à l'ancêtre direct du coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère. *J Virol* 90, 3253-6 (2015).
33. Hu, D. et al. Caractérisation génomique et infectivité d'un nouveau coronavirus de type SRAS chez les chauves-souris chinoises. *Emerg Microbes Infect* 7, 154 (2018).
34. Wang, Y. Enquête préliminaire sur les virus transportés par les chauves-souris dans la zone côtière du sud-est (). Mémoire de Master (2017).
35. Wu, F. et al. Un nouveau coronavirus associé à une maladie respiratoire humaine en Chine. *Nature* 579, 265-269 (2020).
36. Le laboratoire qui a été le premier à partager le génome du nouveau coronavirus est toujours fermé par le gouvernement chinois. *Biodéfense mondiale*, <https://globalbiodefense.com/headlines/chinese-lab-that-first-shared-novel-coronavirus-genome-shut-down/> (2020).
37. Song, W., Gui, M., Wang, X. & Xiang, Y. Cryo-EM structure de la glycoprotéine de pointe du coronavirus du SRAS en complexe avec son récepteur de cellule hôte ACE2. *PLoS Pathog* 14, e1007236 (2018).
38. Li, F., Li, W., Farzan, M. & Harrison, SC Structure du domaine de liaison au récepteur de pointe du coronavirus du SRAS complexé avec le récepteur. *Sciences* 309, 1864-8 (2005).
39. Shang, J. et al. Base structurelle de la reconnaissance des récepteurs par le SRAS-CoV-2. *Nature* (2020).
40. Hassanin, A. Le virus de type SARS-CoV-2 trouvé dans les pangolins captifs du Guangdong devrait être mieux séquencé. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.05.07.077016> (2020).
41. Zhang, D. Les séquences Pan-SL-CoV/GD peuvent provenir d'une contamination. Préimpression (zenodo.org), DOI : 10.5281/zenodo.3885333 (2020).
42. Chan, YA & Zhan, SH Source unique de CoV de pangolin avec un Spike RBD presque identique au SRAS CoV-2. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.07.07.184374> (2020).
43. Lee, J. et al. Aucune preuve de coronavirus ou d'autres virus potentiellement zoonotiques chez les pangolins de Sunda (*Manis javanica*) entrant dans le commerce d'espèces sauvages via la Malaisie. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.06.19.158717> (2020).
44. Becker, MM et al. Le coronavirus synthétique recombinant de type SRAS de chauve-souris est infectieux dans les cellules cultivées et chez les souris. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 19944-9 (2008).
45. Menachery, VD et al. Un groupe de coronavirus de chauve-souris en circulation semblable au SRAS montre un potentiel d'émergence humaine. *Nat Med* 21, 1508-13 (2015).
46. Menachery, VD et al. WIV1-CoV de type SRAS prêt pour l'émergence humaine. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, 3048-53 (2016).
47. Ren, W. et al. Différence d'utilisation des récepteurs entre le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) et le coronavirus de type SRAS d'origine chauve-souris. *J Virol* 82, 1899-907 (2008).
48. Li, X. et al. Émergence du SARS-CoV-2 par recombinaison et forte sélection purificatrice. *bioRxiv* (2020).
49. Hou, Y. et al. Les protéines de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) de différentes espèces de chauves-souris confèrent une sensibilité variable à l'entrée du SRAS-CoV. *Arch Virol* 155, 1563-9 (2010).
50. Yang, Y. et al. Deux mutations étaient essentielles pour la transmission de chauve-souris à l'homme du coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient. *J Virol* 89, 9119-23 (2015).
51. Luo, CM et al. Découverte de nouveaux coronavirus de chauve-souris dans le sud de la Chine qui utilisent le même récepteur que le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient. *J Virol* 92(2018).
52. Cui, J., Li, F. & Shi, ZL Origine et évolution des coronavirus pathogènes. *Nat Rev Microbiol* 17, 181-192 (2019).
53. Wan, Y. et al. Mécanisme moléculaire pour l'amélioration dépendante des anticorps de l'entrée du coronavirus. *J Virol* 94(2020).
54. Li, F. Mécanismes de reconnaissance des récepteurs des coronavirus : une décennie d'études structurales. *J Virol* 89, 1954-64 (2015).
55. Li, F. Structure, fonction et évolution des protéines de pointe du coronavirus. *Annu Rev Virol* 3, 237-261 (2016).

56. Shang, J. et al. Mécanismes d'entrée cellulaire du SRAS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 117, 11727-11734 (2020).
57. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. & Pohlmann, S. Un site de clivage multibasique dans la protéine de pointe du SRAS-CoV-2 est essentiel pour l'infection des cellules pulmonaires humaines. *Mol Cell* 78, 779-784 et 5 (2020).
58. Coutard, B. et al. La glycoprotéine de pointe du nouveau coronavirus 2019-nCoV contient un site de clivage de type furine absent dans le CoV du même clade. *Antiviral Res* 176, 104742 (2020).
59. Claas, CE et al. Virus de la grippe humaine A H5N1 apparenté à un virus de la grippe aviaire hautement pathogène. *Lancet* 351, 472-7 (1998).
60. Watanabe, R. et al. Entrée à partir de la surface cellulaire du coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère avec protéine S clivée comme révélé par le pseudotype de virus portant la protéine S clivée. *J Virol* 82, 11985-91 (2008).
61. Belouzard, S., Chu, VC et Whittaker, GR Activation de la protéine de pointe du coronavirus du SRAS via un clivage protéolytique séquentiel sur deux sites distincts. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 5871-6 (2009).
62. Kido, H. et al. Rôle des protéases cellulaires hôtes dans la pathogenèse de la grippe et de la défaillance multiviscérale induite par la grippe. *Biochim Biophys Acta* 1824, 186-94 (2012).
63. Sun, X., Tse, LV, Ferguson, AD et Whittaker, GR Des modifications du site de clivage de l'hémagglutinine contrôlent la virulence d'un virus de la grippe neurotrope H1N1. *J Virol* 84, 8683-90 (2010).
64. Cheng, J. et al. La sous-unité S2 de la protéine de pointe du coronavirus de la bronchite infectieuse de type QX est un déterminant essentiel du neurotropisme. *Virus* 11(2019).
65. Ito, T. et al. Génération d'un virus influenza aviaire A hautement pathogène à partir d'un isolat de terrain avirulent par passage sur des poulets. *J Virol* 75, 4439-43 (2001).
66. Canrong Wu, YY, Yang Liu, Peng Zhang, Yali Wang, Hua Li, Qiqi Wang, Yang Xu, Mingxue Li, Mengzhu Zheng, Lixia Chen. Furin, une cible thérapeutique potentielle pour COVID-19. Préimpression (chinaXiv), <http://www.chinaxiv.org/abs/202002.00062> (2020).
67. Zeng, LP et al. Le coronavirus WIV1 de type syndrome respiratoire aigu sévère de chauve-souris code pour une protéine accessoire supplémentaire, ORFX, impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. *J Virol* 90, 6573-6582 (2016).
68. Lau, SY et al. Variantes atténuées du SARS-CoV-2 avec délétions à la jonction S1/S2. *Emerg Microbes Infect* 9, 837-842 (2020).
69. Liu, Z. et al. Identification des délétions courantes dans la protéine de pointe du SRAS-CoV-2. *J. Virol* (2020).
70. Ge, XY et al. Détection des alpha- et betacoronavirus chez les rongeurs du Yunnan, Chine. *Virol J* 14, 98 (2017).
71. Guan, Y. et al. Isolement et caractérisation des virus liés au coronavirus du SRAS chez les animaux du sud de la Chine. *Sciences* 302, 276-8 (2003).
72. Ge, XY et al. Isolement et caractérisation d'un coronavirus de type SRAS de chauve-souris qui utilise le récepteur ACE2. *Nature* 503, 535-8 (2013).
73. Lau, SK et al. Virus de type coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère chez les chauves-souris fer à cheval chinoises. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 14040-5 (2005).
74. Kam, YW et al. Des anticorps contre la glycoprotéine trimérique S protègent les hamsters contre le SARS-CoV défi malgré leur capacité à médier l'entrée dépendante de FcγRIIb dans les cellules B in vitro. *Vaccin* 25, 729-40 (2007).
75. Chan, JF et al. Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient : un autre bêtacoronavirus zoonotique provoquant une maladie de type SRAS. *Clin Microbiol Rev* 28, 465-522 (2015).
76. Zhou, J., Chu, H., Chan, JF & Yuen, KY Infection par le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient : interactions virus-cellule hôte et implications sur la pathogenèse. *Virol J* 12, 218 (2015).
77. Yeung, ML et al. Le coronavirus MERS induit l'apoptose dans les reins et les poumons en régulant à la hausse Smad7 et FGF2. *Nat Microbiol* 1, 16004 (2016).
78. Chu, DKW et al. Les coronavirus MERS des chameaux en Afrique présentent une diversité génétique dépendante de la région. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 3144-3149 (2018).
79. Ommeh, S. et al. Preuve génétique du coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-Cov) et de la séroprévalence généralisée chez les chameaux au Kenya. *Virol Sin* 33, 484-492 (2018).
80. Sia, SF et al. Pathogenèse et transmission du SRAS-CoV-2 chez les hamsters dorés. *Nature* (2020).
81. Ren, W. et al. Séquences complètes du génome de deux coronavirus de type SRAS chez les chauves-souris en fer à cheval et analyse de la variation génétique. *J Gen Virol* 87, 3355-9 (2006).

82. Yuan, J. et al. Diversité intraspécifique des coronavirus de type SRAS chez *Rhinolophus sinicus* et ses implications pour l'origine des coronavirus du SRAS chez l'homme. *J Gen Virol* 91, 1058-62 (2010).
83. Ge, XY et al. Coexistence de plusieurs coronavirus dans plusieurs colonies de chauves-souris dans un puits de mine abandonné. *Virol Sin* 31, 31-40 (2016).
84. Hu, B. et al. La découverte d'un riche pool génétique de coronavirus liés au SRAS des chauves-souris fournit de nouvelles informations sur l'origine du coronavirus du SRAS. *PLoS Pathog* 13, e1006698 (2017).
85. Luo, Y. et al. Surveillance longitudinale des bêta-coronavirus chez les roussettes dans la province du Yunnan, en Chine, de 2009 à 2016. *Virol Sin* 33, 87-95 (2018).
86. Kuo, L., Godeke, GJ, Raamsman, MJ, Masters, PS & Rottier, PJ Recyclage du coronavirus par substitution de l'ectodomaine de la glycoprotéine de pointe : franchissement de la barrière des espèces de cellules hôtes. *J Virol* 74, 1393-406 (2000).
87. Drexler, JF et al. Caractérisation génomique du coronavirus lié au syndrome respiratoire aigu sévère chez les chauves-souris européennes et classification des coronavirus basée sur des séquences partielles de gènes d'ARN polymérase dépendantes de l'ARN. *J Virol* 84, 11336-49 (2010).
88. Agnihotram, S. et al. Un modèle de souris pour le sous-groupe 2c de Betacoronavirus utilisant une variante HKU5 de la souche de coronavirus de chauve-souris. *mBio* 5, e00047-14 (2014).
89. Johnson, BA, Graham, RL & Menachery, VD Métagénomique virale, structure des protéines et génétique inverse : stratégies clés pour étudier les coronavirus. *Virologie* 517, 30-37 (2018).
90. Wu, K., Peng, G., Wilken, M., Geraghty, RJ & Li, F. Mécanismes d'adaptation des récepteurs de l'hôte par le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère. *J Biol Chem* 287, 8904-11 (2012).
91. Follis, KE, York, J. & Nunberg, JH Le clivage de la furine de la glycoprotéine de pointe du coronavirus du SRAS améliore la fusion cellule-cellule mais n'affecte pas l'entrée du virion. *Virologie* 350, 358-69 (2006).
92. Yount, B., Denison, MR, Weiss, SR & Baric, RS Assemblage systématique d'un ADNc infectieux complet de la souche A59 du virus de l'hépatite de la souris. *J Virol* 76, 11065-78 (2002).
93. Yount, B. et al. Génétique inverse avec un ADNc infectieux complet du coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 12995-3000 (2003).
94. Almazan, F. et al. Construction d'un clone d'ADNc infectieux de coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère et d'un réplicon pour étudier la synthèse d'ARN de coronavirus. *J Virol* 80, 10900-6 (2006).
95. Scobey, T. et al. Génétique inverse avec un ADNc infectieux complet du coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 16157-62 (2013).
96. Almazan, F., Marquez-Jurado, S., Nogales, A. & Enjuanes, L. Ingénierie d'ADNc infectieux de coronavirus en tant que chromosomes artificiels bactériens. *Méthodes Mol Biol* 1282, 135-52 (2015).
97. Thao, TTN et al. Reconstruction rapide du SARS-CoV-2 à l'aide d'une plateforme de génomique synthétique. *Nature* (2020).
98. Oldfield, LM et al. Ingénierie à l'échelle du génome d'un clone infectieux du virus de l'herpès simplex de type 1 à l'aide de méthodes d'assemblage génomique synthétique. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, E8885-E8894 (2017).
99. Vashee, S. et al. Clonage, assemblage et modification de l'isolat de cytomégalovirus humain primaire Toledo par recombinaison associée à la transformation à base de levure. *mSphere* 2 (2017).
100. Xie, X. et al. Un clone d'ADNc infectieux du SRAS-CoV-2. *Microbe hôte cellulaire* 27, 841-848 e3 (2020).
101. Roberts, A. et al. Un coronavirus du SRAS adapté à la souris provoque la maladie et la mortalité chez les souris BALB/c. *PLoS Pathog* 3, e5 (2007).
102. Roberts, A. et al. Modèles animaux et vaccins contre l'infection par le SRAS-CoV. *Virus Res* 133, 20-32 (2008).
103. Takayama, K. Modèles in vitro et animaux pour la recherche sur le SRAS-CoV-2. *Tendances Pharmacol Sci* 41, 513-517 (2020).
104. Wang, Q. Modèle de souris transgénique hACE2 pour la recherche sur le coronavirus (COVID-19). Le point culminant de la recherche du laboratoire Jackson, <https://www.jax.org/news-and-insights/2020/february/introducing-mouse-model-for-corona-virus#> (2020).
105. Zhang, L. et al. La mutation D614G dans la protéine de pointe SARS-CoV-2 réduit l'excrétion de S1 et augmente l'infectiosité. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.06.12.148726> (2020).
106. Yurkovetskiy, L. et al. Analyse structurelle et fonctionnelle de la protéine de pointe D614G SARS-CoV-2 Une variante. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.07.04.187757> (2020).
107. Korber, B. et al. Suivi des changements dans le pic de SRAS-CoV-2 : preuve que le D614G augmente l'infectiosité de le virus COVID-19. *Cellule* 182, 812-827 e19 (2020).

108. Plante, JA et al. La mutation de pointe D614G modifie la forme physique du SRAS-CoV-2 et la sensibilité à la neutralisation. bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2020.09.01.278689> (2020).
109. Poon, LL et al. Mutations récurrentes associées à l'isolement et au passage du coronavirus du SRAS dans les cellules provenant de primates non humains. J Med Virol 76, 435-40 (2005).
110. Pervushin, K. et al. Structure et inhibition du canal ionique de la protéine d'enveloppe du coronavirus du SRAS. PLoS Pathog 5, e1000511 (2009).
111. Nieto-Torres, JL et al. Canal ionique de la protéine d'enveloppe du coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère l'activité favorise l'aptitude et la pathogenèse du virus. PLoS Pathog 10, e1004077 (2014).